

Ein Inhibitor
des zellspezifischen Transkriptionsfaktors HNF4 α
in frühen *Xenopus*-Embryos

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

des Fachbereichs Bio- und Geowissenschaften, Landschaftsarchitektur
an der Universität-Gesamthochschule Essen

Die der vorliegenden Arbeit zugrundeliegenden Experimente wurden am Institut für Zellbiologie (Tumorforschung) der Universität-Gesamthochschule Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. G. U. Ryffel

2. Gutachter: Prof. Dr. H. Grunz

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: PD Dr. L. Klein-Hitpass

Tag der mündlichen Prüfung: 12.07.2000

Gudrun Peiler
aus Duisburg

April 2000

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	I
I. Einleitung	1
1. HNF4 α , ein Transkriptionsfaktor der Kernrezeptor-Superfamilie	1
2. Die Funktion von HNF4 α in ausdifferenzierten Geweben	3
3. Die Bedeutung von HNF4 α in der Embryogenese	5
4. Ein Inhibitor von HNF4 in frühen <i>Xenopus</i> -Embryonalstadien	8
5. Positive und negative Regulationsmechanismen in der Embryogenese	9
6. Zielsetzung dieser Arbeit	12
II. Material und Methoden	13
1. Chemikalien, Puffer und Enzyme	13
2. Aufarbeitung von HNF4-Inhibitor aus <i>Xenopus</i> -Eiern oder –Ovar	13
2.1 Aufreinigung von Inhibitor aus Ei- und Ovarextrakten durch MonoQ-Anionen- austauschchromatographie	13
2.2 Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie (HPLC)	14
2.3 Proteinfreie Präparation des proteaseresistenten Inhibitorfragmentes	15
3. Verdau von Inhibitorpräparationen mit Proteasen, Nukleasen und N-Glykosidase F	15
4. Gelelution von Inhibitorpräparationen aus SDS-Proteingelen	16
5. Molekularbiologische Standardmethoden und Expressionsvektoren	17
6. Herstellung von Kernextrakten aus transfizierten 293-Zellen	18
6.1 Zellkultur von 293-Zellen	18
6.2 Transiente Transfektionen (CaPO ₄ -Methode)	18
6.3 Herstellung von Kernextrakten aus 293-Zellen	19

7. Herstellung von Proteinen <i>in vitro</i> und partielle Proteolyse von HNF4α	19
8. Gelretardationsanalysen	20
9. Western Blots von denaturierenden und nativen Proteingelen	22
 III. Ergebnisse	 24
1. Der HNF4-Inhibitor trennt sich zusammen mit einem Protein von 25 kDa auf, die inhibitorische Funktion ist aber proteaseresistent	24
1.1 Der HNF4-Inhibitor trennt sich bei Aufreinigung aus Ei- und Ovaryextrakten zusammen mit einem Protein von 25 kDa auf	24
1.2 Der HNF4-Inhibitor ist nicht identisch mit dem 25 kDa-Protein, mit dem zusammen er sich auftrennt	27
1.3 Die inhibitorische Aktivität ist proteaseresistent, der Inhibitor könnte jedoch einen Peptidanteil enthalten	28
1.4 Der HNF4-Inhibitor ist größer als der Porendurchmesser einer Membran mit 5 kDa Ausschlussgröße	32
1.5 Der HNF4-Inhibitor ist kein Glykoprotein mit N-glykosidisch gebundener Zuckereinheit	32
1.6 Die inhibitorische Aktivität ist nukleaseresistent	36
1.7 Der HNF4-Inhibitor ist kein Zink-Chelator	37
2. Durch HPLC oder nach Pronaseverdau kann der HNF4-Inhibitor weiter aufgereinigt werden	38
2.1 Durch reversed phase-HPLC kann HNF4-Inhibitor in analytischem Maßstab weiter aufgereinigt werden	38
2.2 Der Inhibitor kann nach Verdau mit Pronase mit Phenol/Chloroform extrahiert und ausgefällt werden	39
3. Der HNF4-Inhibitor ist kein Ligand von HNF4α	43
3.1 Der HNF4-Inhibitor unterscheidet sich von Acyl-Coenzym A-Thioestern, die als Liganden für HNF4 α vorgeschlagen worden sind	43
3.2 Eine partielle Proteolyse von HNF4 α mit und ohne HNF4-Inhibitor gibt keinen Hinweis auf eine ligandenähnliche Bindung des Inhibitors	46
3.3 Die Ligandenbindungsdomäne von HNF4 α ist nicht nötig für die Inhibierbarkeit der HNF4 α -DNA-Bindung	49
4. Die A/B-Domäne von HNF4α ist notwendig, aber nicht hinreichend für eine Hemmbarkeit der DNA-Bindung durch Inhibitor	49
4.1 Die A/B-Domäne von HNF4 α ist essentiell für die Inhibierbarkeit der HNF4 α -DNA-Bindung durch den HNF4-Inhibitor	50
4.2 Die Spleißvarianten HNF4 α 1 und HNF4 α 7 werden gleichermaßen inhibiert	52
4.3 Die DNA-Bindung eines chimären Konstruktes aus HNF1 α und der A/B-Domäne von HNF4 α wird durch Inhibitor nicht gehemmt	54

5. Der HNF4-Inhibitor verändert die Gelmobilität von HNF4α im nativen Proteingel	55
5.1 Der HNF4-Inhibitor ändert die Gelmobilität von HNF4 α in einem nativen Polyacrylamidgel, aber nicht in einem denaturierenden Proteingel	56
5.2 Durch native Gelelektrophorese kann der Wirkort des Inhibitors in HNF4 α auf die Aminosäuren 55-153 kartiert werden	58
 IV. Diskussion	 60
1. Der HNF4-Inhibitor ist protease- und nukleaseresistent, hydrophil und wird durch eine 5 kDa-Membran zurückgehalten	60
2. Peptid- und proteaseresistenter Anteil des Inhibitors bieten Ansatzmöglichkeiten für eine biochemische Analyse	63
3. Der HNF4-Inhibitor ist kein klassischer Ligand von HNF4 α	64
4. Der Inhibitor verändert spezifisch die Gelmobilität von HNF4 α in nativen Proteingelen	67
5. Die Inhibitorwirkung setzt innerhalb der Aminosäuren 55-153 von HNF4 α an	68
6. Der Inhibitor könnte durch Modifikation oder direkte Bindung auf HNF4 α wirken	72
7. Ansatzmöglichkeiten zur Klärung der physiologischen Bedeutung des HNF4-Inhibitors	74
8. Der HNF4-Inhibitor als potentiell Werkzeug zur Beeinflussung der Aktivität von HNF4 α	77
 V. Zusammenfassung	 78
 Literatur	 80

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
BSA	bovine serum albumine (Rinderserumalbumin)
BXR	benzoat X receptor
CAR	constitutive active receptor
CBP	CREB binding protein
CoA	CoenzymA
COUP-TF	chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor
cpm	counts per minute
CREB	cAMP response element binding protein
dCTP	desoxy-Cytidin-5'-triphosphat
DBD	DNA-Bindedomäne
DEAE	Diethylaminoethyl-
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	1, 3-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
GRBB	gel retardation binding buffer (Bindepuffer für Gelretardationsanalysen)
GRIP	glucocorticoid receptor interacting protein
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HNF	hepatocyte nuclear factor
HPLC	high pressure liquid chromatography (Hochdruckflüssigkeitschromatographie)
kDa	Kilodalton
LBD	Ligandenbindungsdomäne
LXR	liver X receptor
mRNA	messenger-RNA
MS-222	3-Aminobenzoat-Ethylester
NCoR	nuclear receptor corepressor
NGFI-B	nerve growth factor-inducible clone B
p25	Protein von 25 kDa
PBS	phosphate buffered saline
pc	post coitum (nach der Befruchtung)
PCR	polymerase chain reaction
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse transcription-PCR
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Ser	Serin
SHP	short heterodimer partner
SRC	steroid receptor coactivator
Tab.	Tabelle
TAF	TBP-associated factor
TBP	TATA box binding protein
TF	Transkriptionsfaktor
TFA	Trifluoressigsäure
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminoethan
U	units (Einheit für Enzymaktivität)
Vol	Volumen

I. Einleitung

1. HNF4 α , ein Transkriptionsfaktor der Kernrezeptor-Superfamilie

Die Transkription eukaryotischer Gene wird durch regulatorische Proteine kontrolliert, die an spezifische DNA-Elemente in Promotoren von Genen binden und als Transkriptionsfaktoren bezeichnet werden. Da die Transkription die erste und wichtigste Ebene der Regulation der Genexpression ist, bestimmt die Kombination und Aktivität der in einer Zelle vorhandenen Transkriptionsfaktoren letztlich die Identität dieser Zelle. Daher haben zellspezifisch exprimierte Transkriptionsfaktoren eine zentrale Bedeutung sowohl bei der Ausdifferenzierung von Zellen während der Embryogenese als auch beim Erhalt ihres Differenzierungszustandes im adulten Organismus.

Ein solcher zellspezifischer Transkriptionsfaktor, der in der Embryogenese und in der Funktion adulter Gewebe wichtige Funktionen ausübt, ist HNF4 α (für Hepatocyte Nuclear Factor 4 α), der auch als NR2A1 klassifiziert wird (Nuclear Receptors Nomenclature Committee, 1999).

HNF4 α wurde als ein Transkriptionsfaktor in der Leber gefunden, der an ein DNA-Element im Promotor des Transthyretin-Gens bindet, und nach Affinitätsreinigung aus Leberextrakten kloniert (Costa et al., 1989, Sladek et al., 1990). Er ist Mitglied der Kernrezeptor-Superfamilie, zu der viele ligandenaktivierte Transkriptionsfaktoren, wie z. B. Steroidhormonrezeptoren, gehören (Mangelsdorf et al., 1995). Die Kernrezeptor-Superfamilie zeichnet sich durch einen konservierten modularen Aufbau aus fünf Domänen aus (Kumar und Thompson, 1999): Die aminoterminal A/B-Domäne ist wenig konserviert, in ihr liegt bei vielen Kernrezeptoren, so auch bei HNF4 α (Hadzopoulou-Cladaras et al., 1997) eine ligandenunabhängige Transaktivierungsfunktion (AF1). Die C-Domäne (DNA-Bindedomäne) enthält zwei Zinkfinger motive und ist besonders stark konserviert. Eine variable D-Domäne („hinge region“) verbindet die DNA-Bindedomäne mit der in geringerem Grade konservierten E-Domäne (Ligandenbindungsdomäne), die für

die Dimerisierung und Ligandenbindung der Kernrezeptoren zuständig ist und die ligandenabhängige Transaktivierungsfunktion AF2 enthält. Die daran anschließende F-Domäne ist wenig konserviert.

Innerhalb der Kernrezeptoren bilden HNF4-Transkriptionsfaktoren eine eigene Genfamilie. Das *Xenopus*-Homolog zu HNF4 α weist zu dem ursprünglich gefundenen Ratten-HNF4 α (Sladek et al., 1990) eine Sequenzhomologie von 100% in der DNA-Bindedomäne und 87% in der Ligandenbindungsdomäne auf (Holewa et al., 1996). In *Xenopus* wurde außerdem ein zweites Gen, HNF4 β , gefunden, das HNF4 α zu 94% in der DNA-Bindedomäne und zu 72% in der Ligandenbindungsdomäne homolog ist (Holewa et al., 1997). Ein drittes HNF4-Gen ist HNF4 γ , das aus einer menschlichen Nieren-cDNA-Bank isoliert wurde (Drewes et al., 1996). In *Drosophila* wurde ein stark konserviertes HNF4-Homolog gefunden, HNF4(D) (Zhong et al., 1993). Auch im Seidenspinner *Bombyx* wurden zwei HNF4-Isoformen beschrieben (Swevers und Iatrou, 1998).

Die Transkriptionsfaktoren der Kernrezeptor-Superfamilie zeichnen sich durch einen charakteristischen Regulationsmechanismus aus, nämlich die Bindung spezifischer Liganden. Bekannte ligandenregulierte Kernrezeptoren sind zum einen die Steroidhormonrezeptoren, zu denen Östrogen- und Progesteronrezeptor gehören (Übersicht: Beato et al., 1995), zum anderen eine Gruppe von Kernrezeptoren, die mit Retinoid X Rezeptor (RXR) dimerisieren, z. B. Retinsäure-, Thyroidhormon- und Vitamin D-Rezeptor (Übersicht: Mangelsdorf und Evans, 1995). Für die meisten der heute bekannten Kernrezeptoren wurden allerdings bisher keine Liganden identifiziert, sie werden daher als Orphan-Rezeptoren bezeichnet (Übersichtsartikel: O'Malley und Conneely, 1992, Mangelsdorf und Evans, 1995, Enmark und Gustafsson, 1996, Blumberg und Evans, 1998, Willy und Mangelsdorf, 1998).

HNF4 α ist lange als ein solcher Orphan-Rezeptor klassifiziert worden. Die Ligandenbindungsdomäne von Ratten-HNF4 α stimmt jedoch in 44% der Aminosäuren mit der des nächsten HNF4-Verwandten, RXR (Retinoid X Rezeptor) überein (Sladek, 1994). Da RXR durch einen Liganden, 9-cis-Retinsäure, reguliert wird, lässt die hohe Homologie zu HNF4 α in der LBD vermuten, dass auch HNF4 α durch einen Liganden reguliert werden könnte.

Zu Beginn meiner Arbeit war bekannt, dass HNF4 α ohne exogen zugegebenen Liganden in Hefezellen (Fuernkranz et al., 1994), Säugerzellen (Sladek et al., 1990, Jiang et al., 1995) und *in vitro* (Malik und Karathanasis, 1996) Reporterkonstrukte transaktiviert. Im

Verlauf meiner Arbeit sind dann Acyl-CoenzymA(CoA)-Thioester als Liganden für HNF4 α vorgeschlagen worden (Hertz et al., 1998). Sie binden an die Ligandenbindungsdomäne von HNF4 α und beeinflussen sein Transaktivierungspotential und seine DNA-Bindeaffinität. Dabei wirken Verbindungen mit kurzkettigen Fettsäuren (C14, C16) aktivierend, Verbindungen mit langkettigen Fettsäuren (C18, C20) dagegen reprimierend auf HNF4 α (Hertz et al., 1998). Da dieser Befund bisher noch nicht bestätigt wurde, wird HNF4 α weiterhin als Orphan-Rezeptor bezeichnet.

Zusätzlich zur Regulation durch Liganden wird die Aktivität von Kernrezeptoren auch durch Phosphorylierung modifiziert (Weigel, 1996). Beispielsweise kann der Orphan-Rezeptor COUP-TF durch Dopamin über einen Signalweg aktiviert werden, der über seine Phosphorylierung durch Proteinkinase A führt (Power et al., 1991). Für HNF4 α ist gezeigt worden, dass die Phosphorylierung an Tyrosinresten wesentlich für eine hochaffine DNA-Bindung ist (Ktistaki et al., 1995). In HNF4 α aus verschiedenen Zellen korreliert der Grad der Phosphorylierung an Serin- und Threoninresten mit der DNA-Bindung von HNF4 α (Jiang et al., 1997), während andererseits die Phosphorylierung von Serinresten in der DNA-Bindedomäne von HNF4 α die DNA-Affinität verringert (Viollet et al., 1997).

2. Die Funktion von HNF4 α in ausdifferenzierten Geweben

In Vertebraten wird HNF4 α in Leber, Niere, Magen, Darm und Pankreas exprimiert (Sladek et al., 1990, Miquerol et al., 1994, Taraviras et al., 1994). HNF4 α hat eine zentrale Funktion in der Erhaltung der leberspezifischen Genexpression, wie durch die große Anzahl bekannter Zielgene in Leberzellen belegt wird. Zu den leberspezifisch exprimierten Zielgenen von HNF4 α zählen viele Serumproteine wie Apolipoproteine, Transferrin, Transthyretin, Erythropoietin, α 1-Antitrypsin und Blutgerinnungsfaktoren sowie etliche Enzyme, die an Lipid-, Aminosäure- und Glucosestoffwechsel beteiligt sind (Übersichtsartikel: Sladek, 1994).

HNF4 α aktiviert außerdem die Expression eines anderen Transkriptionsfaktors, HNF1 α (Hepatocyte Nuclear Factor 1 α). HNF1 α ist ein Transkriptionsfaktor aus der POU/Homöobox-Familie, der wiederum an der Regulation der leberspezifischen Genexpression beteiligt ist. Die Promotoren von mehr als 20 verschiedenen leberspezifisch

exprimierten Genen enthalten HNF1-Bindestellen (Courtois et al., 1988, Tronche und Yaniv, 1992). Die HNF1 α -Zielgene kodieren für Proteine, die an verschiedenen Leberfunktionen beteiligt sind, darunter Kohlenhydratstoffwechsel, Detoxifikation und die Produktion von Serumproteinen.

In Untersuchungen an kultivierten Hepatoma-Zelllinien zeigte sich eine enge Korrelation zwischen der Expression von HNF1 α und HNF4 α und der leberspezifischen Genexpression in den Zellen (Cereghini et al., 1990, Kuo et al., 1992, Griffo et al., 1993). Dabei wirkt HNF4 α als der wichtigste Regulator von HNF1 α . Der Promotor von HNF1 α enthält eine HNF4-Bindestelle, die in zellfreier Transkription und in transienten Transfektionen für die leberspezifische Aktivierung von HNF1 α notwendig und ausreichend ist (Tian und Schibler, 1991). Stabiles Einbringen von HNF4 α in dedifferenzierte Hepatomazellen kann die Expression von deren endogenem HNF1 α -Gen aktivieren (Kuo et al., 1992). Damit zeigte sich eine transkriptionelle Hierarchie zwischen HNF4 α und HNF1 α in Hepatocyten. Zudem gibt es Hinweise auf einen autoregulatorischen Mechanismus, bei dem HNF1 α durch HNF4 α -Aktivierung seine eigene Expression stimuliert (Bulla und Fournier, 1994). Andererseits bindet HNF1 α an HNF4 α und hemmt dadurch seine eigene Expression sowie die von Genen, die eine HNF4-, aber keine HNF1-Bindestelle haben (Ktistaki und Talianidis, 1997). Gemeinsam mit anderen Faktoren (Cereghini, 1996, Duncan et al., 1998) wirken HNF1 α und HNF4 α so entscheidend an einem transkriptionellen Netzwerk mit, das den Differenzierungszustand von Hepatocyten aufrecht erhält.

Das Spektrum der leberspezifisch exprimierten Zielgene von HNF4 α lässt eine Beteiligung von HNF4 α an der Entstehung verschiedener Stoffwechselkrankheiten annehmen (zusammengefasst in Sladek, 1994). So wird die Expression vieler Apolipoproteine durch HNF4 α reguliert, und veränderte Mengen an Apolipoproteinen im Blut sind assoziiert mit einem erhöhten Risiko für Herzkrankheiten (Breslow, 1988). Belegt ist eine Beteiligung von HNF4 α an bestimmten Fällen von Hämophilie B, bei denen eine HNF4-Bindestelle im Promotor des Blutgerinnungsfaktors IX mutiert ist (Reijnen et al., 1992, 1993). Außerdem ist HNF4 α an der transkriptionellen Aktivierung von zwei Genen des Hepatitis B-Virus beteiligt (Guo et al., 1993, Raney et al., 1997), der chronische Hepatitis, Leberzirrhose und Leberkrebs auslösen kann.

Die Entdeckung der erblichen Krankheit MODY („maturity onset diabetes of the young“) belegte eine wichtige Funktion von HNF4 α im Pankreas. MODY ist eine Form von nicht

insulinabhängigem Diabetes, bei dem die Insulinsekretion aus den β -Zellen des Pankreas gestört ist. Zu dieser Krankheit führen unter anderem Mutationen in HNF4 α (MODY1, Yamagata et al., 1996a) und in HNF1 α (MODY3, Yamagata et al., 1996b). Dabei ist das aus Leberzellen bekannte transkriptionelle Netzwerk, an dem HNF4 α und HNF1 α beteiligt sind, auch für die Funktion der β -Zellen des Pankreas von Bedeutung, denn eine MODY3-Mutation betrifft nicht das HNF1 α -Protein selbst, sondern die HNF4-Bindestelle im Promotor des HNF1 α -Gens (Gagnoli et al., 1997).

3. Die Bedeutung von HNF4 α in der Embryogenese

Zusätzlich zu den beschriebenen Funktionen in ausdifferenzierten Zellen weist eine Reihe von Befunden auf eine wichtige Bedeutung von HNF4 α in der Embryogenese hin.

Dass HNF4 α in der Embryogenese von Vertebraten wesentlich ist, wurde durch Experimente in der Maus gezeigt. Hier können die frühesten HNF4 α -Transkripte am Tag 4,5 nach der Befruchtung (pc) im primären Endoderm und einen Tag später im visceralen Endoderm des Dottersacks nachgewiesen werden, einem extraembryonalen Gewebe, das aus dem primären Endoderm hervorgeht. Mäuse, in denen beide Allele des HNF4 α -Gens durch homologe Rekombination ausgeschaltet wurden (HNF4 α -„knockout“-Mäuse) zeigen eine gestörte Entwicklung und sterben noch vor Vollendung der Gastrulation (Chen et al., 1994). Diese frühe Letalität hat ihren Grund in einer essentiellen Rolle von HNF4 α in der terminalen Differenzierung und spezifischen Steuerung der Genexpression des visceralen Endoderms. In diesem früh vom Embryo gebildeten Versorgungsgewebe werden unter anderem viele Gene exprimiert, die später in der Leber aktiv sind und die in HNF4 α -„knockout“-Mäusen herunterreguliert sind (Duncan et al., 1997).

In embryonalem Gewebe sind die ersten HNF4 α -Transkripte am Tag 8,5 pc in den Leber- und Darmanlagen nachzuweisen (Duncan et al., 1994). Diese frühe Expression legte die Annahme nahe, dass HNF4 α an der Entwicklung dieser Gewebe beteiligt sein könnte. Bestätigt wurde diese Vorstellung durch Untersuchungen an den HNF4 α -„knockout“-Mäusen, die die Gastrulation vollenden können, wenn das viscerele Endoderm aus Wildtyp-Gewebe besteht (Duncan et al., 1997). Die weitere Entwicklung dieser Tiere zeigte, dass HNF4 α zwar für die frühe Spezifikation der Leber nicht gebraucht wird, aber

notwendig ist für die Ausdifferenzierung von Hepatocyten und damit die Bildung eines intakten Lebergewebes, da in „knockout“-Tieren viele essentielle leberspezifische Gene einschließlich HNF1 α nicht exprimiert werden (Li et al., 2000).

Die Bedeutung von HNF4-Transkriptionsfaktoren wird unterstrichen durch die starke Konservierung dieser Faktoren zwischen Vertebraten und Insekten. Das HNF4-Homolog aus *Drosophila*, HNF4(D), ist in der DNA-Bindedomäne auf Aminosäureebene zu 91% und in der Ligandenbindungsdomäne zu 68% identisch mit der Ratten-Sequenz (Zhong et al., 1993). HNF4(D) wird zygotisch bereits früh im Endoderm exprimiert und ist in der weiteren Organogenese in Darm, Fettkörper und Malpighischen Gefäßen zu finden (Zhong et al., 1993). Der Fettkörper entspricht funktionell der Leber, die Malpighischen Gefäße der Niere der Vertebraten. Diese auffällige Konservierung sowohl der Sequenz als auch des Expressionsmusters von HNF4-Transkriptionsfaktoren in der Evolution ist ein starker Hinweis darauf, dass HNF4 α eine von Insekten bis zu Vertebraten konservierte Funktion in der Entwicklung dieser Organe haben könnte. Gestützt wird diese Hypothese durch die Auswirkungen einer chromosomalen Deletion in *Drosophila*, die unter anderem auch das HNF4(D)-Gen umfasst und zu einer Fehlbildung von Mitteldarm und Malpighischen Gefäßen führt (Zhong et al., 1993).

HNF4(D)-Transkripte kommen außerdem schon maternal vor, was auf eine sehr frühe Funktion von HNF4(D) in der Embryogenese hinweist. Die maternalen Transkripte verschwinden noch vor Invagination des Endoderms, dabei bleiben sie am längsten an den beiden Enden des Embryos erhalten, wo später die Blastodermanlagen innerer Organe einschließlich des Mitteldarms liegen (Zhong et al., 1993).

Ein etabliertes Vertebratenmodell zur Analyse von Faktoren in der frühen Embryogenese ist der südafrikanische Krallenfrosch *Xenopus*, dessen Eier leicht zu manipulieren sind und dessen Embryonalentwicklung extrakorporal erfolgt, so dass alle Entwicklungsstadien leicht zugänglich sind. Da regulatorische Prinzipien in der Evolution in großem Ausmaß beibehalten werden, ist anzunehmen, dass in *Xenopus* entdeckte Regulationsmechanismen auch in höheren Vertebraten wiedergefunden werden können.

In der *Xenopus*-Embryogenese scheint die in den Hepatomazellen von Säugern und in den HNF4-„knockout“-Mäusen gefundene Regulation von HNF1 α durch HNF4 α eine Rolle zu spielen. Eine HNF4-Bindestelle im *Xenopus*-HNF1 α -Promotor ist notwendig für die

gezielte Aktivierung eines in das befruchtete Ei injizierten HNF1 α -Promotorkonstruktes im Mittelteil von Larven (Holewa et al., 1996). Die Überexpression von HNF4 α durch Injektion von HNF4 α -mRNA ins befruchtete Ei führt zu einer verfrühten und ektopischen Expression von HNF1 α in der Larve (Holewa et al., 1996). Die embryonale Bedeutung der HNF1 α -Aktivierung durch HNF4 α zeigt auch die Regulation von transgen in *Xenopus* eingebrachten HNF1 α -Promotorkonstrukten, bei denen die HNF4-Bindestelle des HNF1 α -Promotors essentiell für die Aktivierung des Konstruktes im Pronephros, der embryonalen Niere, ist (Ryffel und Lingott, 1999). Da in *Xenopus* HNF4 α wie auch das verwandte HNF4 β als maternales Protein vorliegt (Holewa et al., 1996, 1997), könnten HNF4-Proteine schon ganz am Anfang einer Transkriptionskaskade stehen, die zur Ausdifferenzierung von Zellen führt. Die Aktivierung von HNF1 α durch HNF4 α könnte damit eine Verbindung von maternalen Transkriptionsfaktoren und zellspezifischer Expression liefern (Holewa et al., 1996, Übersichtsartikel: Weber et al., 1996b, Pogge von Strandmann et al., 1997).

Das zeitliche und räumliche Muster des Auftretens zygotischer HNF1 α -Transkripte spricht allerdings dagegen, dass das maternale HNF4 hinreichend zur Aktivierung von HNF1 α ist. Die zygotischen HNF1 α -Transkripte sind zwar schon kurz nach Beginn der zygotischen Transkription zu detektieren (Nastos et al., 1998), doch nicht so unmittelbar, wie man es für ein Zielgen eines maternalen Faktors erwarten würde. Das maternale HNF4-Protein ist im *Xenopus*-Ei in einem Gradienten vom animalen zum vegetativen Pol verteilt (Holewa et al., 1996, 1997). Aus dem animalen Pol entsteht in der Embryogenese Ektoderm und Nervensystem, aber kein Gewebe, das HNF1 α exprimiert. Da überexprimiertes HNF4 α zur Aktivierung von HNF1 α ausreicht, scheint das maternale HNF4 inaktiv zu sein.

Diese funktionelle Inaktivität des maternalen HNF4 wird bestätigt durch den Befund, dass *Xenopus*-Eiextrakte *in vitro* nicht an Oligonukleotide mit HNF4-Bindestelle binden (Pogge von Strandmann, 1995). Ein weiterer Hinweis stammt aus Versuchen mit animalen Kappen, Explantaten des animalen Pols des Embryos im Blastulastadium. In animalen Kappen aus Eiern, in die mRNA für HNF4 α injiziert worden war, kann man HNF1 α nachweisen (Weber et al., 1996b). Inkubiert man dagegen animale Kappen aus nicht injizierten Eiern, wird kein HNF1 α induziert, obwohl das maternale HNF4 am animalen Pol der Eier in der höchsten Konzentration vorliegt.

4. Ein Inhibitor von HNF4 in frühen *Xenopus*-Embryonalstadien

Die beschriebene funktionelle Inaktivität des maternalen HNF4 in animalen Kappen von *Xenopus*-Embryonen zeigt, dass es entweder selbst in einer inaktiven Form vorliegt oder durch einen Faktor im Ei gehemmt wird. Für die letztere Möglichkeit spricht, dass sich durch Anionenaustauschchromatographie bindungsfähiges HNF4 aus *Xenopus*-Eiern abtrennen lässt (Holewa, 1995).

Tatsächlich kann in Extrakten aus frühen *Xenopus*-Embryonalstadien eine Aktivität nachgewiesen werden, die *in vitro* die Bindung von HNF4 aus einem Leberextrakt an DNA hemmt (Abb. 1, aus Holewa, 1995). Die HNF4-DNA-Bindung wird durch ein Gelretardationsexperiment nachgewiesen, bei dem *Xenopus*-Leberextrakt mit einem radioaktiv markierten Oligonukleotid mit einer HNF4-Bindestelle inkubiert und der Ansatz anschließend in einem nativen Polyacrylamidgel aufgetrennt wird. HNF4 α und - β aus dem

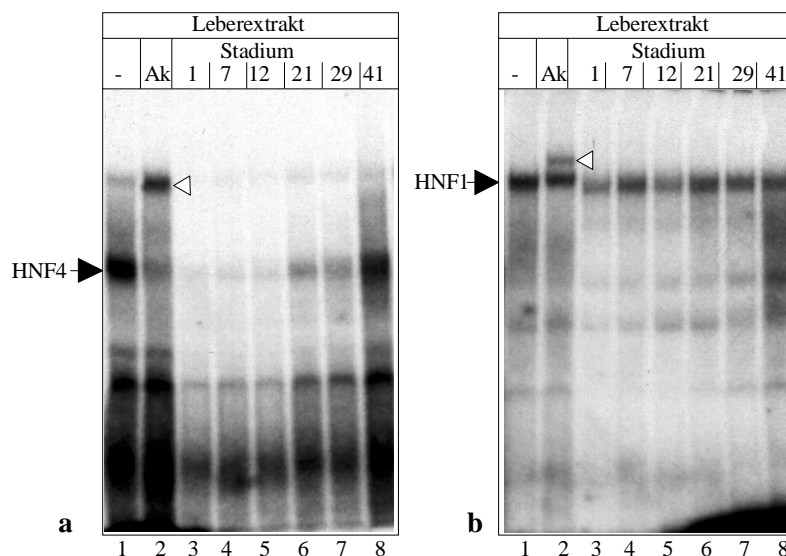


Abb. 1: Die DNA-Bindung von HNF4 wird durch Extrakte aus frühen *Xenopus*-Embryonen spezifisch gehemmt

a) Für eine Gelretardationsanalyse wurde *Xenopus*-Leberextrakt (3 μ l/Spur) mit der HNF4-Bindestelle aus dem humanen Apolipoprotein B-Promotor inkubiert. In Spur 2 wurde ein spezifischer Antikörper (Ak) gegen Ratten-HNF4 α zugegeben, in den Spuren 3 bis 8 je 1 μ l Extrakt aus *Xenopus*-Larven der angegebenen Stadien. Der HNF4-DNA-Komplex ist markiert, der durch den Antikörper im Gel verlangsamte Komplex durch eine Pfeilspitze gekennzeichnet.

b) Wie in a), aber unter Verwendung der HNF1-Bindestelle des Albuminpromotors und eines monoklonalen Antikörpers gegen *Xenopus*-HNF1 α (Spur 2). HNF1 α -DNA-Komplex und durch den Antikörper retardierter Komplex sind markiert.

(Aus Holewa, 1995)

Xenopus-Leberextrakt binden das markierte Oligonukleotid und retardieren es im Gel, so dass der HNF4-Oligonukleotid-Komplex als verlangsamte Bande nachgewiesen wird (Abb. 1a, Bahn 1). Die Spezifität des Komplexes wird durch Zugabe eines HNF4-spezifischen Antikörpers zum Ansatz gezeigt, der durch seine Bindung an HNF4 den HNF4-DNA-Komplex weiter im Gel retardiert (Bahn 2, Pfeilspitze).

Inkubiert man einen Extrakt aus *Xenopus*-Eiern zusammen mit Leberextrakt und Oligonukleotid, wird die HNF4-DNA-Bindung vollständig gehemmt (Bahn 3). Auch Extrakte aus frühen Embryonalstadien hemmen die Bindung (Bahnen 4-7). Die Hemmaktivität der Extrakte nimmt im Laufe der Entwicklung ab und ist in Stadium 41, der freischwimmenden Larve, nicht mehr nachweisbar.

Die DNA-Bindung des nichtverwandten Transkriptionsfaktors HNF1 α wird durch Zugabe von Ei- oder Embryoextrakten nicht beeinträchtigt (Abb. 1b). Das beweist, dass die Embryoextrakte nicht generell Protein-DNA-Interaktionen zerstören, sondern spezifisch auf HNF4 wirken. Dabei wird die DNA-Bindung sowohl von HNF4 α als auch von HNF4 β inhibiert, wie Versuche mit den *in vitro* translatierten Proteinen ergaben (Holewa, 1995).

Xenopus-Eier enthalten demnach einen HNF4-Inhibitor, der die DNA-Bindung von HNF4 verhindert. Die Spezifität seiner Hemmwirkung und die Beschränkung seines Vorkommens auf frühe *Xenopus*-Embryonalstadien sprechen dafür, dass der HNF4-Inhibitor ein spezifischer Repressor von HNF4 in der Embryogenese von *Xenopus* sein könnte.

5. Positive und negative Regulationsmechanismen in der Embryogenese

In der Embryogenese wird durch sukzessive Aktivierung spezifischer Transkriptionsfaktoren das Differenzierungsmuster des entstehenden Organismus festgelegt. Um eine koordinierte Ausdifferenzierung zu gewährleisten, muss die Aktivität der Transkriptionsfaktoren zeitlich wie räumlich exakt begrenzt werden. Daher findet man in der Embryogenese zu jedem Aktivierungsweg in der Regel auch Repressionsmechanismen, die die Aktivität eines Transkriptionsfaktors limitieren.

Ein Beispiel für die Bedeutung des Zusammenspiels von positiver und negativer Regulation in der *Xenopus*-Embryogenese bietet der Wnt1-Signalweg, über den Transkriptionsfaktoren der Tcf/Lef-Familie aktiviert werden. Wnt-Proteine sind sezernierte Glyko-

proteine, die als extrazelluläre Signalmoleküle wirken. Wnt-Proteine der Wnt1-Klasse wirken über Membranrezeptoren der frizzled-Familie und stabilisieren über eine Reihe intrazellulärer Vermittler das Protein β -Catenin, das wiederum Transkriptionsfaktoren der Tcf/Lef-Familie aktiviert, indem es an sie bindet (Übersichtsartikel: Cadigan und Nusse, 1997, Gradl et al., 1999).

Der Wnt1-Signalweg ist evolutionär zwischen Nematoden, Insekten und Vertebraten konserviert und steuert verschiedenste Entwicklungsvorgänge (zusammengefasst in Cadigan und Nusse, 1997, Moon et al., 1997). In *Xenopus* ist eine frühe Funktion die Etablierung der Körperachse. Komponenten des Wnt1-Signalwegs können, als mRNA in befruchtete *Xenopus*-Eier injiziert, die Bildung einer zweiten Achse auslösen. Die Depletion der maternalen Komponente β -Catenin verhindert dagegen die Ausbildung dorsaler Strukturen in der Embryogenese (Heasman et al., 1994). Daher nimmt man an, dass der Wnt1-Signalweg einen für die Ausbildung der Körperachse essentiellen „dorsalen Signalweg“ etabliert (Übersichtsartikel: Heasman, 1997). Zielgene dieses Signalweges sind z. B. siamois (Brannon et al., 1997) und Xtwin (Laurent et al., 1997), die beide nach Überexpression in *Xenopus* eine zweite Achse induzieren können. Später in der Embryogenese üben Wnt-Proteine eine ventralisierende Wirkung auf Mesoderm aus. Ihr Ausschluss aus dem Spemannschen Organisator, einer dorsalen Signalregion der Gastrula, ist eine Voraussetzung für die Kopfbildung (Glinka et al., 1997, Übersichtsartikel: Niehrs, 1999). Eine weitere Funktion des Wnt1-Signalwegs in *Xenopus* ist eine Beteiligung an der neuronalen Musterbildung (McGrew et al., 1997, 1999).

Ein Signalweg, der Transkriptionsfaktoren mit derart kritischen Funktionen aktiviert, muss genau kontrolliert werden. Das geschieht, indem der Wnt1-Signalweg auf mehreren Ebenen reprimiert wird. Zum einen ist eine Reihe von strukturell verschiedenen sekretierten Antagonisten bekannt, die an Wnt binden und so das lösliche Wnt-Signal schon extrazellulär abfangen (zusammengefasst in Gradl et al., 1999). Zum zweiten werden die cytoplasmatischen Komponenten des Signalwegs streng reguliert. Beispielsweise liegt die Glykogensynthase-Kinase 3β (GSK 3β), die das β -Catenin phosphoryliert und damit dem Abbau zuführt, in einem Komplex mit verschiedenen Proteinen vor, die die Aktivität der Kinase beeinflussen (Behrens et al., 1998, Farr et al., 2000). Zum dritten werden die Tcf/Lef-Transkriptionsfaktoren selbst reprimiert, indem sie durch die Bindung von Proteinen zu transkriptionellen Repressoren werden. Bisher wurden zwei Klassen von Pro-

teinen gefunden, die derart als Korepressoren auf Tcf/Lef-Transkriptionsfaktoren wirken, nämlich groucho-Proteine (Übersichtsartikel: Nüsse, 1999) und XCtBP (*Xenopus* C-terminal binding protein, Brannon et al., 1999).

Auch Mitglieder der Kernrezeptor-Überfamilie und ihr charakteristischer Regulationsmechanismus durch Liganden haben entscheidende Funktionen in der Embryogenese. Ein Beispiel ist das Vitamin A-Derivat Retinsäure, das als Ligand die Kernrezeptoren Retinoid X Rezeptor (RXR) und Retinsäurerezeptor (RAR) aktiviert. In der Embryogenese von Vertebraten hat ein Übermaß an Retinsäure einen drastischen teratogenen Effekt (zusammengefasst in Conlon et al., 1995). Retinsäure kontrolliert in Vertebraten eine Vielfalt von Entwicklungsvorgängen (Conlon et al., 1995, Sucov und Evans, 1995, Means und Gudas, 1995), unter anderem die Musterbildung im zentralen Nervensystem (Übersichtsartikel: Durston et al., 1998). Ein negativer Regulationsmechanismus für diesen Signalweg in der *Xenopus*-Embryogenese scheint das Retinsäure-metabolisierende Enzym CYP26 zu sein, das in *Xenopus*-Embryos differentiell exprimiert wird und die Musterbildung im sich entwickelnden Gehirn verändert, wenn man es überexprimiert (Hollemann et al., 1998).

In frühen *Xenopus*-Embryonalstadien wurden außerdem andere Retinoide gefunden, die als Liganden an RAR binden und von denen eine Funktion in der Embryogenese angenommen wird (Blumberg et al., 1996).

Auch Orphan-Rezeptoren wie HNF4 α können potentiell durch Liganden reguliert sein, deren Entdeckung neue physiologische Signalwege aufdecken kann (Blumberg und Evans, 1998, Willy und Mangelsdorf, 1998). So führte der zunächst als Orphan-Rezeptor in *Xenopus* gefundene Kernrezeptor BXR zur Entdeckung einer neuen Klasse von Liganden, Benzylsäurederivaten, deren Vorkommen in frühen *Xenopus*-Embryonalstadien eine Rolle in der Embryogenese suggeriert (Blumberg et al., 1998). Die ligandenabhängigen Kernrezeptoren werden in der Regel durch die Bindung ihrer natürlichen Liganden aktiviert. Erst vor kurzem wurde entdeckt, dass endogene Liganden einen Kernrezeptor auch reprimieren können: Der vor allem in Leber exprimierte Kernrezeptor CAR ist konstitutiv aktiv (Choi et al., 1997) und der erste bekannte Kernrezeptor, der durch seinen natürlichen Liganden inaktiviert wird (Forman et al., 1998, Picard, 1998). Dieser Fund lässt spekulieren, dass auch in der Embryogenese bisher unbekannte negativ regulierend wirkende Liganden von Bedeutung sein könnten.

6. Zielsetzung dieser Arbeit

Der in frühen Embryonalstadien von *Xenopus* gefundene HNF4-Inhibitor könnte eine wichtige Funktion als negativer Regulator von HNF4 α in der *Xenopus*-Embryogenese haben. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die molekulare Identität und die Wirkweise dieses HNF4-Inhibitors zu analysieren.

Dabei stand am Anfang die Frage, welcher Substanzklasse der HNF4-Inhibitor zuzuordnen ist. Insbesondere sollte geklärt werden, ob der Inhibitor ein Protein ist. Seine Größe sollte abgeschätzt werden, und es sollte untersucht werden, ob er als funktionelle Einheit einen Zucker- oder Nukleinsäureanteil enthalten könnte.

Eine wichtige Zielsetzung war die Etablierung einer weitergehenden biochemischen Aufreinigung des Inhibitors für strukturelle und funktionelle Analysen.

Da HNF4 α ein Orphan-Rezeptor ist, könnte der Inhibitor als negativ regulierender Ligand wirken. Um diese Möglichkeit zu überprüfen, sollte zunächst bestimmt werden, ob er identisch mit den als HNF4 α -Liganden vorgeschlagenen Acyl-CoenzymA-Thioestern sein könnte. Außerdem sollte geprüft werden, ob er die Konformation von HNF4 α ändert, wie man durch eine partielle Proteolyse nachweisen kann. Schließlich sollte analysiert werden, ob die Ligandenbindungsdomäne von HNF4 α notwendig ist für die Hemmbarkeit der HNF4 α -DNA-Bindung durch Inhibitor.

Um weitere Anhaltspunkte zur Funktionsweise des HNF4-Inhibitors zu bekommen, sollte der Bereich des HNF4 α -Moleküls eingegrenzt werden, in der die Inhibitorwirkung ansetzt. Dazu sollten Deletionskonstrukte und Spleißvarianten von HNF4 α und chimäre Konstrukte aus HNF4 α und HNF1 α auf die Hemmbarkeit ihrer DNA-Bindung untersucht werden.

Da bisher eine Inhibitorwirkung nur in Gelretardationsexperimenten gezeigt werden konnte, war es schließlich ein wesentliches Ziel, eine Wirkung des Inhibitors auf das HNF4 α -Protein nachzuweisen, die unabhängig von der HNF4 α -DNA-Bindung ist.

II. Material und Methoden

1. Chemikalien, Puffer und Enzyme

Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, in p.a. Qualität von den Firmen Fluka (Neuulm), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) oder Sigma (München) bezogen.

Lösungen und Puffer, deren Zusammensetzung nicht gesondert vermerkt ist, wurden nach Protokollen der Methodensammlung von Sambrook et al. (1989) hergestellt.

Restriktionsenzyme und modifizierende Enzyme für DNA und RNA stammten von den Firmen Biolabs (Schwalbach), Boehringer Mannheim, Gibco BRL (Karlsruhe) und Pharmacia (Freiburg).

2. Aufarbeitung von HNF4-Inhibitor aus *Xenopus*-Eiern oder –Ovar

2.1 Aufreinigung von Inhibitor aus Ei- und Ovarextrakten durch MonoQ-Anionenaustauschchromatographie

Zur MonoQ-Aufreinigung von HNF4-Inhibitor wurde das bereits etablierte Verfahren (Holewa, 1995 und unveröffentlichte Daten) modifiziert.

Zur Aufarbeitung aus *Xenopus*-Eiern wurden Weibchen von *Xenopus laevis* durch Injektion von 400-600 U humanem Choriongonadotropin (Pregnesin, Serono Pharma GmbH, Unterschleißheim) in die dorsalen Lymphsäcke zur Eiablage gebracht (Sive et al., 1995). Es wurden frisch abgelegte, unbefruchtete oder durch Überstreichen mit einem *Xenopus*-Hoden befruchtete Eier verwendet. Die Gelege wurden durch Inkubation in 2% Cystein-Hydrochlorid (pH 8,0) für 1,5 min unter Schütteln enthüllt und mehrmals mit je 0,5 l H₂O gewaschen (Sive et al., 1995).

Zur Aufarbeitung aus Ovar wurden *Xenopus*-Weibchen in 0,5% MS 222 (Sigma) betäubt (mindestens 15 min), dann wurden die Ovarien entnommen und sofort in flüssigem Stickstoff gefroren. Sie wurden auf Trockeneis zermörsert.

Die Eier bzw. das Ovarmaterial wurden mit H₂O durch Auf- und Abziehen in der Pasteurpipette und Vortexen extrahiert (ca. 2,5 µl H₂O / Ei; 6 ml H₂O / Ovar) und zentrifugiert (10 min, 13000 g). Der Überstand wurde 10 min bei 100 °C erhitzt und ultrazentrifugiert (20 min, 50000 rpm, Beckmann TL-100 Ultrazentrifuge).

Anschließend wurde der Überstand zur Vorfraktionierung auf eine DEAE-Säule aufgetragen (Säulenvolumen 2 ml, DEAE-Sepharose CL-6B von Pharmacia) und durch einen Schritt von 50 mM NaCl (5% Puffer B) auf 500 mM NaCl (50% Puffer B) step-eluiert (Puffer A: 20 mM Tris-HCl pH 8, 10 % Glycerol, 0,1 mM EDTA, Puffer B zusätzlich mit 1 M NaCl).

Die den Inhibitor enthaltenden Fraktionen wurden durch eine Gelretardationsanalyse identifiziert und vereinigt. Sie wurden durch Verdünnen mit Puffer A auf 200 mM NaCl gebracht und auf eine mit 20% Puffer B equilibrierte MonoQ-Anionenaustauschersäule (1 ml Volumen, Pharmacia) aufgetragen. Die Säule wurde mit 20 ml 20% Puffer B gespült, dann wurde innerhalb von 15 ml mit einem Gradienten von 20% auf 100% Puffer B eluiert. Das Eluat wurde in 0,5 ml-Fractionen gesammelt, der Inhibitor durch Einsetzen von je 1 µl der Fraktionen in Gelretardationsansätze lokalisiert.

2.2 Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie (HPLC)

Eine Aufreinigung von Inhibitor mittels Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie (HPLC) wurde freundlicherweise von Dr. Kai Krüger, Institut für Zellbiologie (Tumorforschung), Universitätsklinikum Essen, durchgeführt. Dazu wurde ein HPLC-System der Firma Waters verwendet und eine „reversed phase“-Säule (Nova-Pak C₁₈, 100 mm x 8 mm, Waters) eingesetzt.

Als Probe wurde eine durch Gelelektion von Proteinen befreite Inhibitorpräparation verwendet. Dazu wurde 0,5 ml einer MonoQ-Inhibitorfraktion aus einer Aufreinigung aus 5000 *Xenopus*-Eiern durch Ultrafiltration mit „Ultrafree“ (Millipore) auf 50 µl eingengt, in einem 15% SDS-Proteingel (nach Sambrook et al., 1989) aufgetrennt, aus dem Gel in H₂O eluiert (s. 5) und das Eluat in einer Vakuumzentrifuge auf 50 µl eingengt.

Die HPLC-Säule wurde mit dieser Probe beladen. Bei einer Flussrate von 0,8 ml/min erfolgte zunächst ein Vorlauf von 5 min H₂O, dann ein Gradient von H₂O/0% Trifluoressigsäure (TFA) auf H₂O/0,1% TFA innerhalb von 5 min, anschließend ein Gradient von H₂O/0,1% TFA auf Acetonitril/0,1% TFA innerhalb von 30 min. Das Eluat wurde in Fraktionen von 1 ml aufgefangen. Zur Identifizierung von Fraktionen, die Inhibitor enthalten, wurden je 200 µl der Fraktionen in einer Vakuumzentrifuge eingedampft und in 10 µl H₂O aufgenommen, 1 µl der so erhaltenen Fraktionen wurde in Gelretardationsansätze eingesetzt.

2.3 Proteinfreie Präparation des proteaseresistenten Inhibitorfragmentes

Zur Herstellung einer proteinfreien Präparation des proteaseresistenten Teils des Inhibitors wurde Inhibitor aus der MonoQ-Aufreinigung mit 2 Vol Ethanol gefällt, mit 1 mg/ml Pronase (Boehringer Mannheim) nach Angaben des Herstellers verdaut, mit 1 Vol Phenol/Chloroform extrahiert und erneut über das beschriebene MonoQ-Programm aufgereinigt.

3. Verdau von Inhibitorpräparationen mit Proteasen, Nukleasen und N-Glykosidase F

Verdau mit Proteasen: Je 2 µl MonoQ-Inhibitorpräparation wurden in 20 µl-Ansätzen mit Trypsin (sequencing grade), Proteinase K oder Pronase (alle Proteasen von Boehringer Mannheim) nach Angaben des Herstellers verdaut. Die Verdauungen wurden durch Standard-SDS-Gelelektrophorese mit anschließender Coomassie Blue-Färbung des Gels (nach Sambrook et al., 1989) kontrolliert.

Verdau mit Pronase, die anschließend in Gelretardationsanalysen eingesetzt werden sollten, wurden abweichend von der Herstellerangabe (1-2 mg/ml) mit 0,2 mg/ml Pronase verdaut.

DNase-Verdau: 1 µl einer MonoQ-Inhibitorpräparation oder H₂O (Kontrolle) wurden in einem 10 µl-Ansatz mit 10 U/µl DNaseI (RNase-frei, Boehringer) in 100 mM Tris-HCl, pH 8,8 für 1 h bei 37 °C inkubiert. Zur Inaktivierung der DNase für Gelretardationsanalysen wurden die Ansätze 10 min bei 100 °C inkubiert. Für Gelretardationsanalysen wurde je 1 µl der Ansätze eingesetzt. Zur Kontrolle des Verdaus wurde ein dritter Ansatz gemeinsam mit 300 ng Plasmid-DNA inkubiert und in einem Standard-DNA-Agarosegel (nach Sambrook et al., 1989) analysiert.

RNase-Verdau: 1 µl einer MonoQ-Inhibitorpräparation oder H₂O (Kontrolle) wurden in einem 10 µl-Ansatz mit 10 U/µl RNaseA (Boehringer), die zuvor durch Erhitzen auf 100 °C, 15 min DNase-frei gemacht worden war, in 100 mM Tris-HCl, pH 8,8 für 1 h bei 37 °C inkubiert. Für Gelretardationsanalysen wurde je 1 µl der Ansätze eingesetzt. Zur Kontrolle des Verdaus wurde ein dritter Ansatz gemeinsam mit 300 ng *in vitro* transkribierter mRNA inkubiert und in einem RNA-Agarosegel (nach Sambrook et al., 1989) aufgetrennt.

Verdau mit N-Glykosidase F: 5 µl einer MonoQ-Inhibitorpräparation wurden in einem 30 µl-Ansatz mit dem N-Glycosidase F Deglycosylation Kit (Boehringer Mannheim) nach Angaben des Herstellers behandelt. Zur Kontrolle des Verdaus wurden die Kontroll-Glykoproteine des Herstellers verwendet. Sie wurden mit HNF4-Inhibitor ohne bzw. mit N-Glykosidase F inkubiert und in einem SDS-Proteingel (nach Sambrook et al., 1989) analysiert.

4. Gelelution von Inhibitorpräparationen aus SDS-Proteingelen

Zur Lokalisierung des Inhibitors in einem denaturierenden Proteingel wurden 2 µl einer MonoQ-Inhibitorpräparation in einem 15% SDS-Polyacrylamidgel (nach Sambrook et al., 1989) aufgetrennt. Die Gelbahn wurde in Stücke geschnitten und die in den Gelstücken enthaltenen Substanzen durch Schütteln in 400 µl H₂O (2 h, 37 °C) eluiert. Substanzen wurden durch Zugabe von 1,6 ml Aceton (-80 °C) aus den Eluatzen ausgefällt, abzentrifugiert (15 min, 13000 g), in der Vakuumzentrifuge getrocknet und in 20 µl H₂O aufge-

nommen. Der Inhibitor wurde durch Einsatz von je 1 μ l der Präparationen in Gelretardationsansätze lokalisiert.

Nach Behandlung des Inhibitors mit N-Glykosidase F wurde die Hemmaktivität wie beschrieben, aber in einem Proteingel nach Schägger lokalisiert (Schägger und von Jagow, 1987).

5. Molekularbiologische Standardmethoden und Expressionsvektoren

Molekularbiologische Techniken, wie Modifikationen von DNA, Anzucht und Transformation von Bakterien, Plasmid-DNA-Präparationen oder Agarose-Gelelektrophoresen, wurden nach Sambrook et al. (1989) durchgeführt.

Expressionsvektoren:

HNF4 α (<i>Xenopus</i>):	Pogge von Strandmann, 1995
HNF4 α (Ratte):	Zapp et al., 1993
Mt-HNF4 α :	Lausen et al., 2000 (humane Sequenz mit myc-tag)
HNF4 Δ AB:	Nakhei, 1997 (Ratten-Sequenz)
Mt-HNF4 Δ EF:	Lausen et al., 2000 (myc-getaggte humane Sequenz der Aminosäuren 1-153 von HNF4 α , abgeleitet von der MODY-Mutante R154X)
HNF4 α 1:	chimäres Konstrukt aus A/B-Domäne von Maus-HNF4 α 1 und CDEF-Domänen von Ratten-HNF4 α (Nakhei, 1997)
HNF4 α 7:	chimäres Konstrukt aus A/B-Domäne von Maus-HNF4 α 7 und CDEF-Domänen von Ratten-HNF4 α (Nakhei, 1997)
Mt-HNF1 α :	Wild et al., 2000 (humane Sequenz)

Mt(α 1)HNF1 α und Mt(α 7)HNF1 α :

Zur Herstellung dieser Konstrukte wurde die A/B-Domäne der chimären Konstrukte HNF4 α 1 bzw. HNF4 α 7 (s. o.) mittels PCR amplifiziert. Für die Amplifizierung der codierenden Sequenz für Aminosäure 1-54 von HNF4 α 1 wurde das Primerpaar HNA1F und

ABREV eingesetzt, für die Amplifizierung der codierenden Sequenz für Aminosäure 1-32 von HNF4 α 7 das Primerpaar HNA7F und ABREV. Die amplifizierten Sequenzen wurden in die HindIII-Schnittstelle von Mt-HNF1 α (s. o.) zwischen myc-tag und HNF1 α -Sequenz kloniert. Die Sequenzen der PCR-amplifizierten Fragmente sowie der Erhalt des Leserahmens wurden durch Ansequenzierung der Konstrukte überprüft.

Sequenzen der verwendeten Primer:

HNA1F: 5'-CACCAAGCTTCCATGCGACTCTCTAAAACC-3'

HNA7F: 5'-CACCAAGCTTCCATGGTCAGTGTGAACGCG-3'

ABREV: 5'-CCACAAGCTTCCAGGCTGTTGGATGAATTG-3'

6. Herstellung von Kernextrakten aus transfizierten 293-Zellen

6.1 Zellkultur von 293-Zellen

293-Zellen (E1A-transformierte embryonale menschliche Nierenzelllinie) wurden bei 37 °C, 7,2 % CO₂ und 95% wassergesättigter Atmosphäre in DMEM (Dulbecco's modified Eagles medium, Biochrom) mit je 100 U/ml Penicillin und Streptomycin, 2 mM L-Glutamin und 10% hitzeinaktiviertem fötalen Kälberserum (Biochrom) kultiviert.

6.2 Transiente Transfektionen (CaPO₄-Methode)

Transiente Transfektionen wurden mit der Calciumphosphat-Copräzipitationsmethode (Gorman et al., 1982) durchgeführt. 20 h vor der Transfektion wurden 3 x 10⁶ Zellen pro 10 cm-Zellkulturschale in 10 ml Medium ausgesät, 3 h vor der Transfektion das Medium gewechselt.

Ein Präzipitationsansatz für eine Zellkulturschale enthielt 20 μ g DNA, mit 1 mM EDTA auf 75 μ l Volumen aufgefüllt, 262,5 μ l H₂O, 375 μ l 2xHBS (274 mM NaCl, 10 mM KCl, 1,4 mM Na₂HPO₄, 1,1 mM Dextrose, 42 mM HEPES, pH 7,05) und 37,5 μ l 2,5 M CaCl₂. Der Ansatz wurde 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, dann tropfenweise über die

Zellen verteilt, und es wurden sofort 20 µl 50 mM Chloroquin zugegeben. Die Zellen wurden 4 h im Brutschrank inkubiert. Dann wurde das Medium abgesaugt, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, für 2 min in 15% Glycerol in PBS inkubiert und nochmals zweimal mit PBS gewaschen. Dann wurde Medium zugegeben und die Zellen im Brutschrank inkubiert.

6.3 Herstellung von Kernextrakten aus 293-Zellen

2 d nach der Transfektion wurden Hochsalz-Kernextrakte aus den transfizierten Zellen hergestellt. Dazu wurden die Zellen mit PBS (4 °C) gewaschen. Sie wurden in 0,7 ml PBS gegeben, mit einem Gummisspatel von der Kulturschale gelöst und in ein Eppendorfgefäß überführt, dieser Vorgang wurde einmal wiederholt. Die Zellen wurden abzentrifugiert (5 min, 1000 rpm, 0 °C, Hettich 24-48R Kühlzentrifuge), in 0,5 ml Puffer A suspendiert, 10 min auf Eis inkubiert, erneut abzentrifugiert (5 min, 2000 rpm, 0 °C) und in 250 µl Puffer A aufgenommen. Sie wurden in einem Handhomogenisator aufgebrochen. Die Kerne wurden abzentrifugiert (10 min, 10000 rpm, 0 °C), in 100 µl Puffer C aufgenommen und 30 min bei 0 °C und unter häufigem Vortexen inkubiert. Dann wurde 20 min bei 50000 rpm zentrifugiert (2 °C, Beckmann TL-100 Ultrazentrifuge), der Überstand aliquotiert und bei –80 °C gelagert.

Puffer A: 10 mM HEPES (pH 7,6), 1,5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0,5 mM DTT

Puffer C: 20 mM HEPES (pH 7,6), 25% (v/v) Glycerol, 420 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM EDTA, 0,5 mM PMSF, 0,5 mM DTT

7. Herstellung von Proteinen *in vitro* und partielle Proteolyse von HNF4α

Zur Synthese von Proteinen *in vitro* wurde eine gekoppelte Transkription/Translation im Kaninchen-Reticulocytenlysat (Promega) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Zur partiellen Proteolyse wurde 1 µl *in vitro* synthetisiertes, ³⁵S-markiertes HNF4α 15 min bei Raumtemperatur mit 0,5 µl H₂O oder 0,5 µl einer 10fach konzentrierten MonoQ-Inhibitorpräparation inkubiert. Die Ansätze wurden mit verschiedenen Konzen-

trationen Trypsin (sequencing grade, Boehringer Mannheim) nach Angaben des Herstellers für 15 min inkubiert. Die Ansätze wurden in einem 12% SDS-Proteingel (Sambrook et al., 1989) aufgetrennt, das Gel getrocknet und ein Kodak-Film damit exponiert.

8. Gelretardationsanalysen

Gelretardationsanalysen mit Ratten-Leberkernextrakt oder mit *in vitro* synthetisierten Proteinen wurden leicht modifiziert nach Kugler et al. (1990) durchgeführt. Ratten-Leberkernextrakt wurde mir freundlicherweise von Dr. Ludger Klein-Hitpass und Fabian Esser, Institut für Zellbiologie, Uniklinik Essen, zur Verfügung gestellt. Ein typischer Gelretardationsansatz enthielt 0,3 µl Leberkernextrakt oder 1-2 µl *in vitro* synthetisierten Proteins, 50 ng Lachssperma-DNA und ggf. 1 µl 1:10 verdünnten Antikörper oder Antiserum, 1 µl HNF4-Inhibitor in verschiedenen Verdünnungen oder 1 µl Acyl-CoenzymA-Thioester auf die angegebenen Endkonzentrationen. HNF4-Inhibitor wurde in H₂O verdünnt eingesetzt, Kontrollansätze enthielten 1 µl H₂O. Eine erste Inkubation erfolgte in einem 15 µl-Ansatz in GRBB (10 mM HEPES pH 7,6, 60 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 4% Ficoll) für 15 min bei Raumtemperatur (RT), dann wurden 10-20000 cpm/Ansatz (5 µl Volumen in GRBB) ³²P-markiertes Oligonukleotid mit HNF4- bzw. HNF1-Bindestelle (H4 bzw. HP-1, s. u.) zugegeben und für weitere 15 min bei RT inkubiert. Die entstandenen Protein-DNA-Komplexe wurden in 4% Polyacrylamid-Gelen in 0,25 x TBE für 1,5 h bei 100 V aufgetrennt, die Gele getrocknet und mit Kodak-Filmen belegt, die über Nacht bis zu 3 d exponiert wurden.

Bei Einsatz von proteaseverdauten Inhibitorpräparationen wurden zur Inaktivierung der Proteasen den Gelretardationsansätzen wie folgt Proteaseblocker zugesetzt:

Trypsin: Zusatz von 0,5 µl Aprotinin (10 mg/ml) und 0,1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) zum Gelretardationsansatz

Proteinase K: Zusatz von 0,5 µl Aprotinin (10 mg/ml) zum Gelretardationsansatz

Pronase: 5 µl eines Verdauansatzes mit 0,2 mg/ml Pronase wurde 1:1 mit „Complete“-Proteaseinhibitormischung (Boehringer Mannheim) gemischt und mit 1 µl einer Mischung zu gleichen Teilen aus PMSF (10 mM), Leupeptin (1 mg/ml), Pepstatin (1 mg/ml) versetzt (alle Proteaseinhibitoren von

Boehringer Mannheim), 1 µl des so behandelten Ansatzes wurde in einen Gelretardationsansatz gegeben.

Gelretardationsansätze mit Kernextrakten aus transfizierten 293-Zellen enthielten 1 µl Kernextrakt (s. 6.3), 2 µl Puffer C (s. 6.3), 100 ng Lachssperma-DNA und ggf. 0,1 µl Antikörper und/oder 1 µl HNF4-Inhibitor in verschiedenen Verdünnungen. Die Inkubation erfolgte wie beschrieben, aber in GRBB ohne KCl.

Gelretardationsanalysen nach Hertz et al. (1998) wurden mit Ratten-Leberkernextrakt oder His-getaggttem HNF4α (Holewa, 1995) in Bindepuffer nach Hertz et al. (11 mM HEPES, pH 7,9, 50 mM KCl, 1 mM DTT, 2,5 mM MgCl₂, 10% Glycerol) durchgeführt, Gel und Elektrophoresepuffer enthielten 0,6 x TBE.

Oligonukleotide:

H4: HNF4-Bindestelle aus dem *Xenopus*-HNF1α-Promotor (Zapp et al., 1993), Sequenz:

5'-GATCCACTTTGTGGGGTCCAAAGTTCAGTAA-3'
3'-GTGAAACACCCCAGGTTTCAAGTCATTGAAC-5'

HP-1: HNF1-Bindestelle aus dem *Xenopus laevis*-Albuminpromotor (Schorpp et al., 1988), Sequenz:

5'-AGCTTGAGGTTAATAATTTTCCA-3'
3'-ACTCCAATTATTAAAAGGTCTAG-5'

Die Oligonukleotide wurden durch eine Auffüllreaktion mit Klenow-Polymerase und α-³²P-dCTP radioaktiv markiert.

Antikörper:

66II: polyklonaler Antikörper gegen die A/B- und C-Domäne von Ratten-HNF4α (Stumpf et al., 1995), eingesetzt zum Nachweis von HNF4α in Gelretardationsanalysen mit Leberkernextrakten

αIII: polyklonaler Antikörper gegen die F-Domäne von HNF4α (Holewa et al., 1997), eingesetzt zum Nachweis von HNF4α und HNF4ΔAB

- 55:** monoklonaler Antikörper gegen ein Epitop aus dem ABCD-Fragment von Ratten-HNF4 α (Holewa et al., 1996), eingesetzt zum Nachweis von HNF4 Δ EF
- RAD1:** monoklonaler Antikörper gegen ein Epitop aus der Aktivierungsdomäne von Ratten-HNF1 α (Bartkowski et al., 1993), eingesetzt zum Nachweis von HNF1 α in Gelretardationsanalysen mit Leberkernextrakten
- 9E10:** Monoklonaler Antikörper gegen den myc-tag (Evan et al., 1985), eingesetzt zum Nachweis von myc-getaggten Konstrukten

9. Western Blots von denaturierenden und nativen Proteingelen

Denaturierende Proteingele: Zum Nachweis der in 293-Zellen überexprimierten HNF4-Konstrukte wurden Standard-SDS-Proteingele (nach Sambrook et al., 1989) mit 3 μ l Kernextrakt / Bahn gefahren.

Native Proteingele: Zur Analyse der Gelmobilität von HNF1 α - und HNF4 α -Konstrukten nach Inkubation mit Inhibitor wurden je Ansatz 3 μ l Kernextrakt aus transfizierten 293-Zellen, 1 μ l MonoQ-Inhibitorpräparation und 16 μ l GRBB (10 mM HEPES pH 7,6, 60 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 4% Ficoll) 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend in einem 4% Polyacrylamidgel in 0,25 x TBE für 1,5 h bei 100 V aufgetrennt.

Denaturierung von Proteinen im Gel: In einem Fall wurden die in einem nativen Gel aufgetrennten Proteine nachträglich im Gel denaturiert. Dazu wurde das Gel nach der Elektrophorese in Denaturierungslösung (62,5 mM Tris-HCl, pH 6,7, 100 mM β -Mercaptoethanol, 2% SDS) 20 min bei 37 °C unter Schütteln inkubiert.

Western Blots: Die Proteine wurden durch Blotten bei 1,5 mA/cm² Gel für 1 h in Transferpuffer (48 mM Tris, 39 mM Glycin, 0,04% SDS, 20% Methanol) auf eine Nitrocellulosemembran (Schleicher und Schuell, Dassel) übertragen. Die Membran wurde über Nacht bei 4 °C mit Blockingreagenz (Amersham, Braunschweig) blockiert, 1 h bei Raumtemperatur (RT) mit Erstantikörper in PBS/0,05% Tween inkubiert, 3 x 10 min mit PBS/0,05% Tween gewaschen, 1 h bei RT mit Zweitantikörper in PBS/0,05% Tween in-

kubiert und abermals gewaschen. Der Zweitantikörper wurde mit dem Enhanced Chemoluminescence-System (ECL-System, Amersham) entsprechend den Angaben des Herstellers detektiert.

Erstantikörper:

39f: Monoklonaler Antikörper gegen ein Epitop in der C-Domäne von Ratten-HNF4 α (Sel et al., 1996), 1:5 verdünnt eingesetzt zur Detektion von HNF4 α und HNF4 Δ AB

9E10: Monoklonaler Antikörper gegen den myc-tag (Evan et al., 1985), 1:5 verdünnt eingesetzt zur Detektion von Mt-HNF4 α , HNF4 Δ EF, Mt-HNF1 α und abgeleiteten Konstrukten

Zweitantikörper:

Peroxidase-gekoppelter rabbit anti-mouse-Antikörper (Dianova), 1:5000 verdünnt eingesetzt

III. Ergebnisse

1. Der HNF4-Inhibitor trennt sich zusammen mit einem Protein von 25 kDa auf, die inhibitorische Funktion ist aber proteaseresistent

Eier und frühe Embryonalstadien von *Xenopus* enthalten eine Substanz, die spezifisch die Bindung von HNF4 α an DNA hemmt (Holewa, 1995). Dieser HNF4-Inhibitor könnte eine wichtige Rolle in der *Xenopus*-Embryogenese spielen und ist außerdem als potentieller Regulator eines Orphan-Rezeptors von größtem Interesse. In dieser Arbeit sollte zunächst die molekulare Identität des HNF4-Inhibitors charakterisiert werden.

1.1 Der HNF4-Inhibitor trennt sich bei Aufreinigung aus Ei- und Ovaryextrakten zusammen mit einem Protein von 25 kDa auf

HNF4-Inhibitor konnte, wie erstmals von Holewa beschrieben (Holewa, 1995), aus Extrakten von *Xenopus*-Eiern isoliert werden. Außerdem war gezeigt worden, dass der Inhibitor hitzeresistent ist (Holewa, unveröffentlichte Daten). Als ersten Aufreinigungsschritt habe ich daher den Ei-Rohextrakt 10 min auf 100 °C erhitzt und die ausgefallenen Proteine abzentrifugiert. Der Überstand wurde über eine DEAE-Säule fraktioniert, dann folgte die Auftrennung in einer FPLC-MonoQ-Anionenaustauschersäule. Eine MonoQ-Aufreinigung von HNF4-Inhibitor aus 1000 *Xenopus*-Eiern ist exemplarisch in Abb. 2 dargestellt.

Abb. 2a zeigt das Elutionsprofil des Eiextraktes von der MonoQ-Säule. Dargestellt ist die Absorption des Eluats bei 280 nm während der Elution in einem Salzgradienten von 0,2 bis 1 M NaCl. Das Eluat wurde in Fraktionen von 0,5 ml aufgefangen.

Durch Zugabe von 1 μ l der MonoQ-Fractionen zu Gelretardationsansätzen mit Ratten-Leberkernextrakt und einem markierten Oligonukleotid mit HNF4-Bindestelle wurde die inhibitorische Aktivität auf die Fraktionen 6 bis 13 lokalisiert (Daten nicht gezeigt). Um

den Haupt-Peak an Inhibitor genauer zu lokalisieren, wurden je 0,1 µl der MonoQ-Fraktionen 6 bis 12 zu Gelretardationsansätzen gegeben (Abb. 2b). Die Spezifität des Komplexes aus DNA und dem im Rattenleber-Kernextrakt enthaltenen HNF4α (Pfeil in Abb. 2b) wurde durch Zugabe des gegen Ratten-HNF4α gerichteten polyklonalen Antikörpers 66II nachgewiesen, der den Komplex im Gel retardiert (Pfeilspitze in Abb. 2b). Durch die MonoQ-Fraktionen 8 und 9 wird die Bildung des HNF4α-DNA-Komplexes fast vollständig gehemmt, durch die Fraktionen 10 und 11 noch partiell. Der Inhibitor eluiert damit von der Anionenaustauschersäule MonoQ bei Salzkonzentrationen von 400-500 mM (Abb. 2a, Fraktionen 8-10).

Zur Analyse der Proteine in den inhibitorhaltigen Fraktionen wurden die MonoQ-Fraktionen 6-12 in einem SDS-Proteingel aufgetrennt und das Gel mit Coomassie gefärbt (Abb. 2c). Die Fraktionen mit der stärksten Hemmaktivität enthalten eine hohe Konzentration eines Proteins von ca. 25 kDa (Fraktionen 8, 9; Pfeil in Abb. 2c). In den schwächer hemmenden Fraktionen ist dieses Protein in geringerer Menge vorhanden (Fraktionen 10, 11), in Fraktionen ohne Hemmaktivität (6, 7, 12) dagegen nicht detektierbar. In den Fraktionen mit Hemmaktivität (8-11) sind außerdem vier Proteinbanden von höherem Molekulargewicht (>70 kDa, Pfeilspitzen in Abb. 2c) nachweisbar, deren Intensität jedoch nicht mit der Hemmaktivität der Fraktionen korreliert.

Um größere Mengen an HNF4-Inhibitor präparieren zu können, wurde er auch aus *Xenopus*-Ovar aufgereinigt. Auch bei dieser Präparation korrelierte das Auftreten einer Proteinbande von ca. 25 kDa mit der Hemmaktivität der Fraktionen einer MonoQ-Auftrennung (Daten nicht gezeigt).

Holewa hatte außerdem gezeigt, dass sich die Hemmaktivität und das 25 kDa-Protein auch nach Gelfiltrationssäule (Superose), Kationenaustauscher (MonoS) und hydrophober Interaktionschromatographie (Phenyl- und Octylsepharose) nicht voneinander trennen lassen (Holewa, unveröffentlichte Daten).

Da sich somit die inhibitorische Aktivität stets mit einem 25 kDa-Protein zusammen trennte, lag die Annahme nahe, dass das 25 kDa-Protein der HNF4-Inhibitor ist.

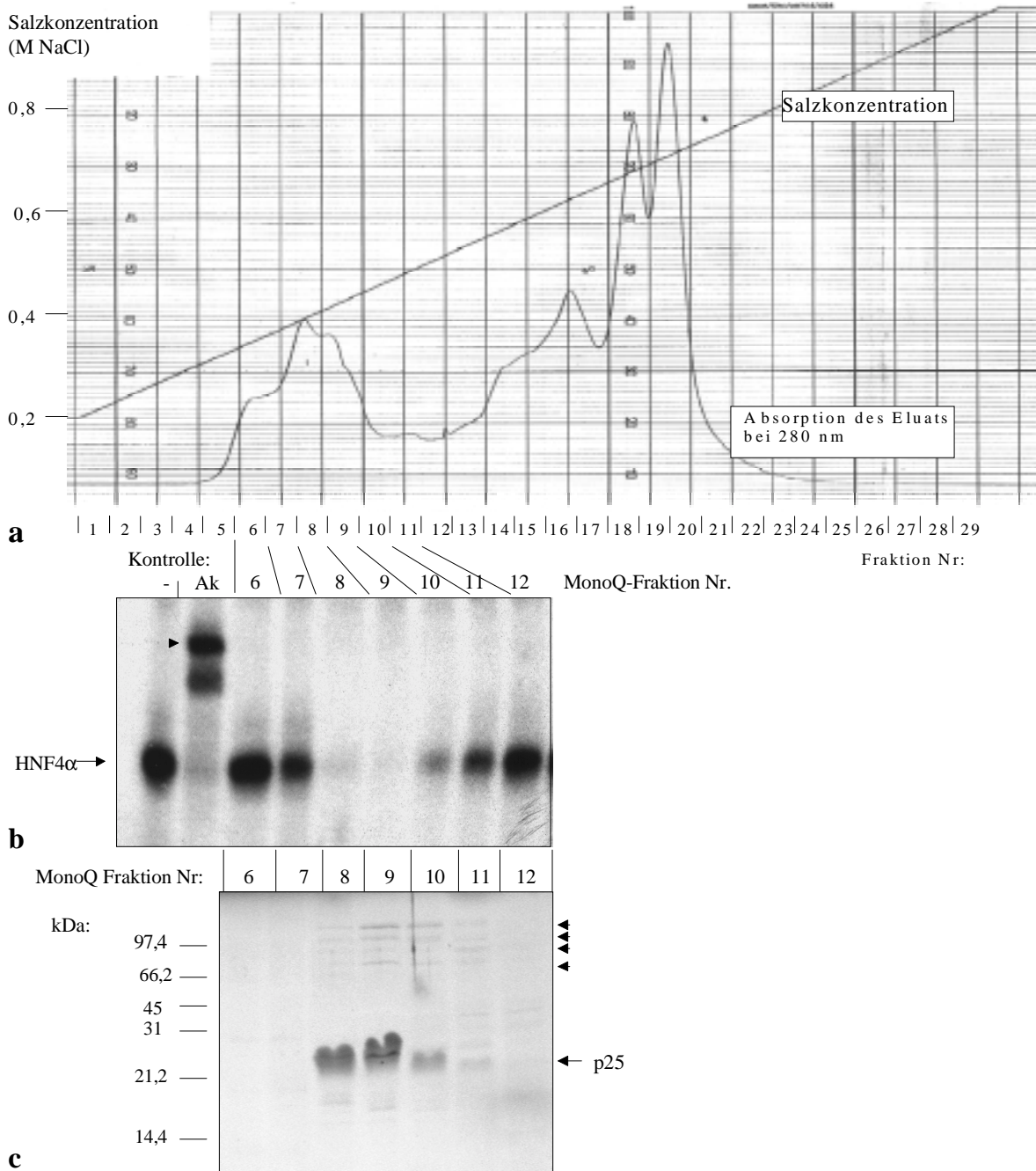


Abb. 2: Aufreinigung von HNF4-Inhibitor aus einem fraktionierten Rohextrakt aus 1000 *Xenopus*-Eiern mittels Anionenaustauschchromatographie (MonoQ)

a) Elutionsprofil (Absorption bei 280 nm) eines fraktionierten Eiextraktes von einer FPLC-MonoQ-Säule bei einer Gradientenelution von 0,2 bis 1 M NaCl.

b) Gelretardationsanalyse der Hemmaktivität in den MonoQ-Fractionen 6 bis 12. In Gelretardationsansätze mit Ratten-Leberkernextrakt und ^{32}P -markiertem Oligonukleotid mit der HNF4-Bindestelle aus dem *Xenopus*-HNF1 α -Promotor wurden je 1 μl einer 1:10-Verdünnung der angegebenen MonoQ-Fractionen gegeben. Kontrolle: ohne Zugabe von Fractionen, -: ohne, Ak: mit dem polyklonalen, HNF4-spezifischen Antikörper 66II. Der mit HNF4 α bezeichnete Pfeil weist auf den HNF4 α -DNA-Komplex. Der durch den Antikörper weiter im Gel retardierte Komplex ist durch eine Pfeilspitze markiert.

c) Coomassie-gefärbtes SDS-Polyacrylamidgel mit den MonoQ-Fractionen 6 bis 12. Je 5 μl der angegebenen Fractionen wurden in einem 15% SDS-Proteingel aufgetrennt. Die Molekulargewichte von Markerproteinen in kDa sind angegeben. Das Protein von ca. 25 kDa (p25), das mit der Hemmaktivität zusammen läuft, ist durch einen Pfeil, andere angefärbte Proteinbanden sind durch Pfeilspitzen markiert.

1.2 Der HNF4-Inhibitor ist nicht identisch mit dem 25 kDa-Protein, mit dem zusammen er sich auftrennt

Um zu überprüfen, ob das 25 kDa-Protein und der HNF4-Inhibitor tatsächlich identisch sein können, wurde durch eine Gelelution bestimmt, ob beide sich auch unter denaturierenden Bedingungen zusammen auftrennen. Dazu wurde eine Bahn eines SDS-Proteingels, auf der eine Inhibitor-enthaltende MonoQ-Fraktion aufgetrennt worden war, in Stücke geschnitten (Abb. 3a). In den Gelstücken enthaltene Substanzen wurden eluiert, ausgefällt, rekonstituiert und in ein Gelretardationsexperiment eingesetzt (Abb. 3b).

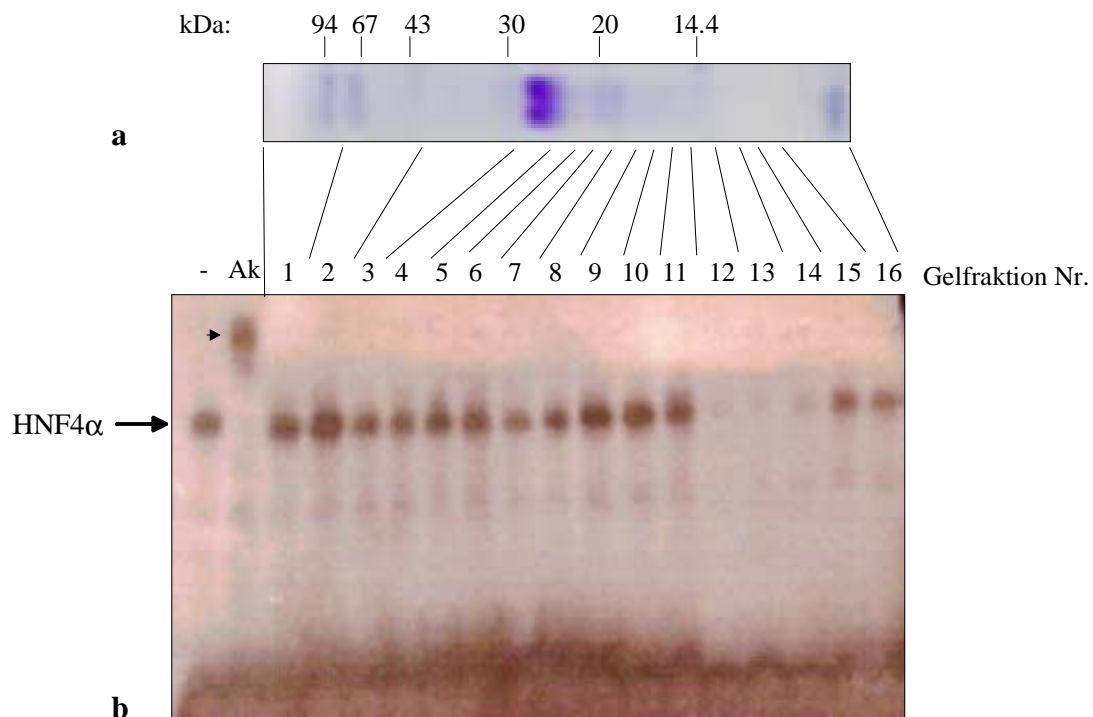


Abb. 3: Lokalisation des HNF4-Inhibitors in einem SDS-Polyacrylamidgel

a) 2 µl einer MonoQ-Inhibitorfraktion wurden in einem SDS-Proteingel aufgetrennt, eine Bahn des Gels mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt. Die Molekulargewichte von Markerproteinen in kDa sind angegeben.

b) Um die inhibitorische Aktivität zu lokalisieren, wurde eine benachbarte Bahn, wie durch die Linien gezeigt, in Stücke geschnitten. In den Gelstücken enthaltene Substanzen wurden eluiert, ausgefällt und rekonstituiert. Je 1 µl der so erhaltenen Gelfractionen wurde zu Gelretardationsansätzen mit Leberkernextrakt und einer markierten HNF4-Bindestelle gegeben. Der HNF4α-DNA-Komplex und der durch den HNF4-spezifischen Antikörper 66II (Ak) weiter retardierte Komplex (Pfeilspitze) sind markiert.

Das Eluat aus dem Gelstück, das das 25 kDa-Protein enthält, hemmt die HNF4 α -DNA-Bindung nicht (Gelfraktion 4). Stattdessen findet sich die die HNF4 α -Bindung hemmende Aktivität weiter unten im Proteingel wieder (Gelfraktionen 12, 13, 14). Sie läuft damit in einem Bereich, der Protein-Molekulargewichten von weniger als 14 kDa entspricht. Auffällig ist, dass die hemmende Aktivität sich nicht in einer scharfen Bande im Proteingel auftrennt, sondern diffus läuft.

Um auszuschließen, dass Eluate aus dem SDS-Proteingel die Protein-DNA-Interaktionen im Gelretardationsexperiment beeinträchtigen, wurde parallel zum gezeigten Versuch eine unbeladene Bahn des Proteingels eluiert. Keine der Fraktionen aus dieser Bahn hemmte die HNF4 α -DNA-Bindung (Daten nicht gezeigt). Außerdem wurden zur Identifikation des HNF4-Inhibitors, der ja die HNF1 α -DNA-Bindung nicht beeinflusst (Holewa 1995, vgl. Einleitung), die hemmenden Gelelutionsfraktionen auf die Spezifität ihrer Hemmung untersucht. Sie beeinträchtigten die DNA-Bindung von HNF1 α aus Leberkernextrakt nicht (Daten nicht gezeigt).

Der HNF4-Inhibitor ist somit nicht identisch mit dem 25 kDa-Protein, mit dem zusammen er sich auftrennt, sondern wandert mit einer Geschwindigkeit durch ein SDS-Proteingel, die einem Protein von weniger als 14 kDa entsprechen würde.

1.3 Die inhibitorische Aktivität ist proteaseresistent, der Inhibitor könnte jedoch einen Peptidanteil enthalten

In einem Bereich von weniger als 14 kDa konnten weder in einem Coomassie-gefärbten (vgl. Abb. 2c) noch in einem silbergefärbten Proteingel (nicht gezeigt) Proteinbanden nachgewiesen werden. Damit stellte sich die Frage, ob der HNF4-Inhibitor überhaupt ein Protein ist.

Zur Klärung dieser Frage wurde MonoQ-aufgereinigter Inhibitor mit dem Proteasegemisch Pronase verdaut und dann auf seine Hemmaktivität hin untersucht.

In Vorversuchen wurde zunächst festgestellt, dass in einem Verdauansatz mit 0,2 mg/ml Pronase die Proteaseaktivität durch ein Gemisch von Proteasehemmern blockierbar ist, so dass der Verdau für Gelretardationsanalysen eingesetzt werden kann, ohne dass das HNF4 α des Leberkernextraktes durch die Pronase zerstört würde (nicht gezeigt).

Um zu überprüfen, ob die Pronase in dieser Konzentration Proteine vollständig verdaut, wurden 2 μ l einer MonoQ-Inhibitorfraktion mit 20 μ g Rinderserumprotein (BSA)

gemischt, mit 0,2 mg/ml Pronase inkubiert und in einem SDS-Proteingel aufgetrennt (Abb. 4a). Sowohl das BSA als auch die Proteine aus der MonoQ-Inhibitorfraktion (bei >70 kDa und 25 kDa, Bahn 1) sind nach dem Pronaseverdau im Coomassie-gefärbten Gel nicht mehr nachweisbar (Bahn 2). Die eingesetzte Konzentration von Pronase genügt also zum vollständigen Verdau von Proteinen.

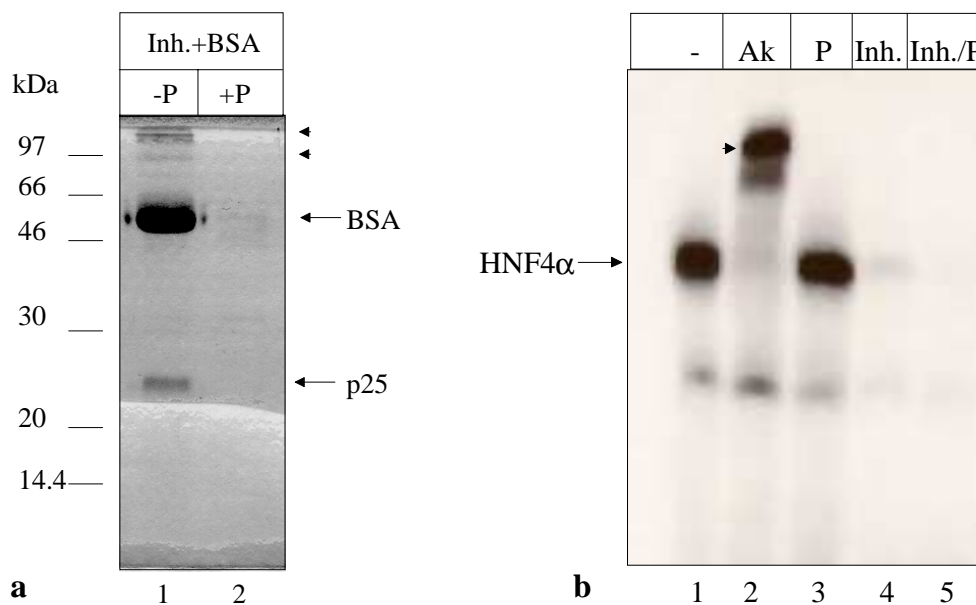


Abb. 4: Hemmaktivität des HNF4-Inhibitors nach Proteaseverdau

a) SDS-Polyacrylamidgel zur Kontrolle des Pronase-Verdau. 2 µl einer MonoQ-Inhibitorfraktion wurde mit 20 µg BSA gemischt (Inh.+BSA), in einem 15% SDS-Proteingel aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt. Bahn 1 zeigt eine unbehandelte (-P), Bahn 2 eine mit Pronase verdaute (+P) Inhibitor-BSA-Mischung. Molekulargewichte von Markerproteinen in kDa sind angegeben, die Positionen von BSA, dem 25 kDa-Protein (p25) und höhermolekularen Proteinen (Pfeilspitzen) der MonoQ-Inhibitorpräparation sind markiert.

b) Zu Gelretardationsansätzen mit Leberkernextrakt und einer markierten HNF4-Bindestelle wurden wie angegeben ein Pronase-Kontrollverdau ohne Inhibitor (P, Bahn 3), unverdauter HNF4-Inhibitor (Inh., Bahn 4) und eine gleiche Menge an Pronase-verdaulichem Inhibitor (Inh./P, Bahn 5) gegeben. In den Bahnen 3 - 5 wurden Protease-Blocker in die Gelretardationsansätze eingeschlossen. Die Position des HNF4α-DNA-Komplexes ist angegeben, der durch den Antikörper 66II (Ak) weiter retardierte Komplex durch eine Pfeilspitze markiert.

Die Hemmaktivität des mit Pronase behandelten Inhibitors wurde in einer Gelretardationsanalyse untersucht (Abb. 4b). Ein Pronase-haltiger Kontrollansatz ohne Inhibitor beeinträchtigt die HNF4 α -DNA-Bindung nicht, das heisst die Pronase ist durch das zugegebene Proteaseinhibitorgemisch blockiert (vgl. Bahn 3 mit Bahn 1). 0,1 μ l einer MonoQ-Inhibitorpräparation hemmt die HNF4 α -DNA-Bindung des Leberkernextraktes fast vollständig (Bahn 4). Eine entsprechende Menge derselben Fraktion nach Verdau mit Pronase hemmt die HNF4 α -Bindung vollständig (Bahn 5).

Pronase ist eine Mischung verschiedener Proteasen unterschiedlicher Spezifität, die Proteine bis auf einzelne Aminosäuren abbaut. Da die inhibitorische Aktivität auf die HNF4 α -DNA-Bindung resistent gegen diesen Verdau ist, wird sie nicht von einem Protein ausgeübt.

Auch nach einem Verdau mit Trypsin oder Proteinase K war die inhibitorische Aktivität gegenüber der unverdauten Inhibitorfraktion nicht beeinträchtigt, sondern schien sogar leicht verstärkt (Daten nicht gezeigt).

Diese leicht verstärkte Hemmung in den Ansätzen mit Protease-verdaulichem Inhibitor könnte bedeuten, dass die inhibitorische Aktivität durch den Verdau erhöht wird.

Um zu untersuchen, ob der HNF4-Inhibitor vom Proteaseverdau verändert wird, wurden unbehandelter und mit Protease verdauter HNF4-Inhibitor in einem SDS-Proteingel aufgetrennt und die Hemmaktivität im Gel lokalisiert (vgl. 1.2). Abb. 5a zeigt eine Gelretardationsanalyse der aus dem Proteingel eluierten Fraktionen von unverdaulichem und mit Trypsin verdautem Inhibitor. Während die inhibitorische Aktivität vor dem Proteaseverdau in den Fraktionen 10 und 11 enthalten ist (Abb. 5a, oberes Feld), findet sie sich nach dem Verdau in den Fraktionen 11-13 (Abb. 5a, unteres Feld).

Um eine unspezifische Hemmung von Protein-DNA-Interaktionen durch Bestandteile des SDS-Proteingels oder durch die eingesetzte Protease auszuschließen, wurde die Spezifität der Hemmung in diesen Fraktionen überprüft (Abb. 5b). Im Gegensatz zur HNF4 α -DNA-Bindung (Bahnen 1, 5-7, 11-14) wird die DNA-Bindung von HNF1 α aus dem Leberkernextrakt (Bahn 3) von keiner der eluierten Fraktionen beeinträchtigt (Bahnen 8-10, 15-18). Die Hemmung der HNF4 α -DNA-Bindung ist somit auf den spezifisch auf HNF4 α wirkenden Inhibitor zurückzuführen.

Nach Verdau mit Proteinase K zeigte der Inhibitor im SDS-Proteingel ebenfalls eine erhöhte Mobilität (Daten nicht gezeigt).

Dass der Inhibitor nach einem Proteaseverdau im SDS-Proteingel weiter läuft, also kleiner wird, ist ein Hinweis darauf, dass er einen Proteinanteil oder zumindest (eine) Peptidbindung(en) enthält. Die inhibitorische Funktion wird jedoch nicht von einem Proteinanteil ausgeübt, da sie gegen den Protease-Verdau resistent ist.

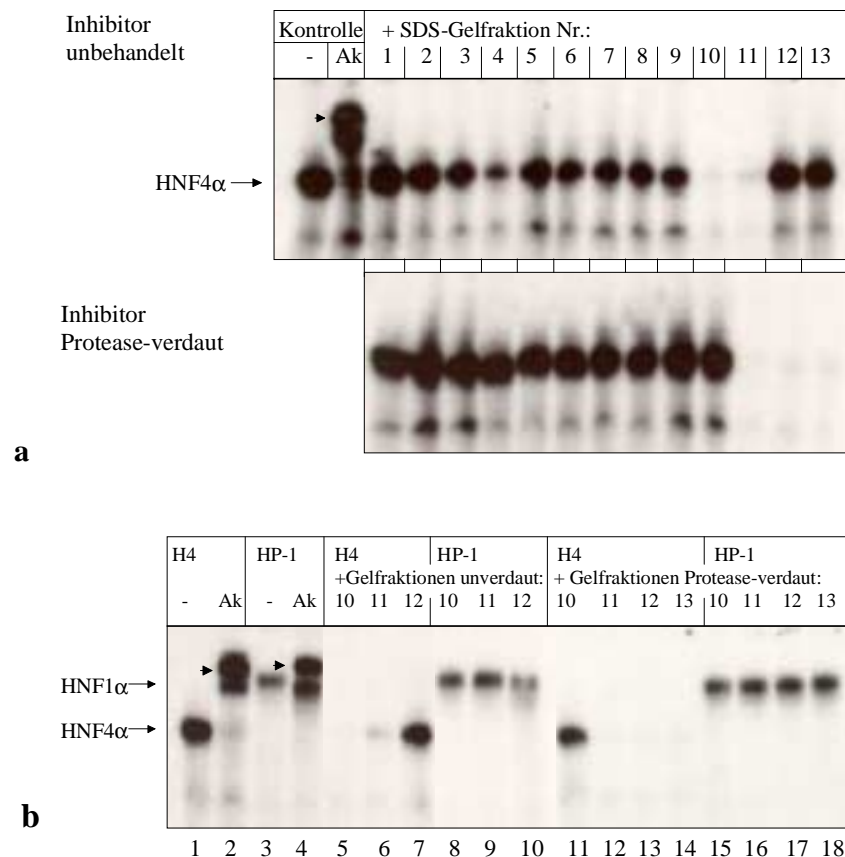


Abb. 5: Laufverhalten des HNF4-Inhibitors in einem SDS-Polyacrylamidgel nach Proteaseverdau

2 μ l einer MonoQ-Inhibitorfraktion wurden unverdaut und nach Verdau mit Trypsin in einem SDS-Proteingel aufgetrennt und die inhibitorische Aktivität wie in Abb. 3 beschrieben lokalisiert.

a) Gelretardationsanalyse der erhaltenen Gelfraktionen von unverdaulichem (oben) und Protease-verdaulichem (unten) HNF4-Inhibitor. Die Gelfraktionen des eluierten Proteingels wurden zu Gelretardationsansätzen mit Leberkernextrakt und einem markierten Oligonukleotid mit HNF4-Bindestelle gegeben. Alle Ansätze enthalten Proteaseblocker. Der HNF4 α -DNA-Komplex ist gekennzeichnet, der durch den Antikörper 66II im Gel weiter retardierte Komplex durch eine Pfeilspitze markiert.

b) Gelretardationsanalyse der hemmenden Fraktionen aus (a) mit Leberkernextrakt und markierten Oligonukleotiden mit einer HNF4-Bindestelle (H4) oder einer HNF1-Bindestelle (HP-1) zur Kontrolle der Spezifität der Hemmung. Alle Ansätze enthalten Proteaseblocker. Die Positionen des HNF4 α -DNA- und des HNF1 α -DNA-Komplexes im Gel sind angegeben. Ak: Zum Gelretardationsansatz wurde der HNF4-spezifische Antikörper 66II (bei H4) bzw. der HNF1-spezifische Antikörper RAD1 (bei HP-1) zugegeben. Die durch die Antikörper retardierten Protein-DNA-Komplexe sind durch Pfeilspitzen markiert.

1.4 Der HNF4-Inhibitor ist größer als der Porendurchmesser einer Membran mit 5 kDa Ausschlussgröße

Da der HNF4-Inhibitor kein reines Polypeptid ist, kann seine Größe im denaturierenden Proteingel nicht bestimmt werden. Um das Molekulargewicht des Inhibitors vor und nach Proteaseverdau abzuschätzen, wurden Inhibitorpräparationen durch eine Membran mit einer Ausschlussgröße von 5 kDa zentrifugiert. Das Konzentrat dieser Ultrafiltration wurde durch dreimaliges Waschen mit je 10 Vol H₂O zu über 99% von Salzen und niedermolekularen Stoffen befreit und mit H₂O wieder auf das Ausgangsvolumen aufgefüllt. Konzentrat und Durchfluss wurden dann in Gelretardationsanalysen auf ihre Hemmaktivität hin untersucht.

Behandelt man eine MonoQ-Inhibitorpräparation auf diese Weise (Abb. 6a), findet sich die inhibitorisch wirksame Substanz im Konzentrat (Bahn 3), während der Durchfluss keine Hemmaktivität zeigt (Bahn 4). Der HNF4-Inhibitor ist daher größer als der Porendurchmesser einer Membran von 5 kDa Ausschlussgröße.

Auch das inhibitorisch wirksame Fragment, das durch Trypsinverdau einer Inhibitorpräparation entsteht, ist größer als der Porendurchmesser dieser Membran (Daten nicht gezeigt).

Nach Verdau mit Pronase dagegen findet sich Hemmaktivität im Durchfluss durch die 5 kDa-Membran (Abb. 6b, Bahn 5). Gleichzeitig wird aber auch inhibitorische Aktivität im Konzentrat zurückgehalten (Bahn 4). Das pronaseresistente Inhibitorfragment kann also teilweise durch die Membranporen dringen. Es ist somit kleiner als das natürlich vorkommende Molekül und als das Trypsinfragment.

1.5 Der HNF4-Inhibitor ist kein Glykoprotein mit N-glykosidisch gebundener Zuckereinheit

Der HNF4-Inhibitor selbst ist kein Protein, scheint aber eine Peptideinheit zu enthalten. Somit könnte er ein modifiziertes Protein sein, an das eine proteaseresistente, inhibitorisch wirksame Substanz gebunden ist. Eine naheliegende Möglichkeit ist daher, dass der Inhibitor ein Glykoprotein sein könnte.

Die verbreitetste Form der Glykosylierung ist die N-glykosidische Bindung von Oligosaccharideinheiten an Asparaginseitenketten eines Proteins. Um zu überprüfen, ob der

Die Aktivität der N-Glykosidase F in Anwesenheit einer MonoQ-Inhibitorfraktion wurde durch Verdau von Kontroll-Glykoproteinen geprüft (Abb. 7b). Die Kontroll-Glykoproteine (Bahn 1) zeigen nach der Deglykosylierung durch N-Glykosidase F im SDS-Proteingel eine erhöhte Mobilität (Bahn 2). In Anwesenheit der Inhibitorfraktion (Bahn 3) verdaut die Glykosidase die Kontroll-Glykoproteine genauso effizient wie ohne zugegebenen Inhibitor (vgl. Bahn 3 mit Bahn 2).

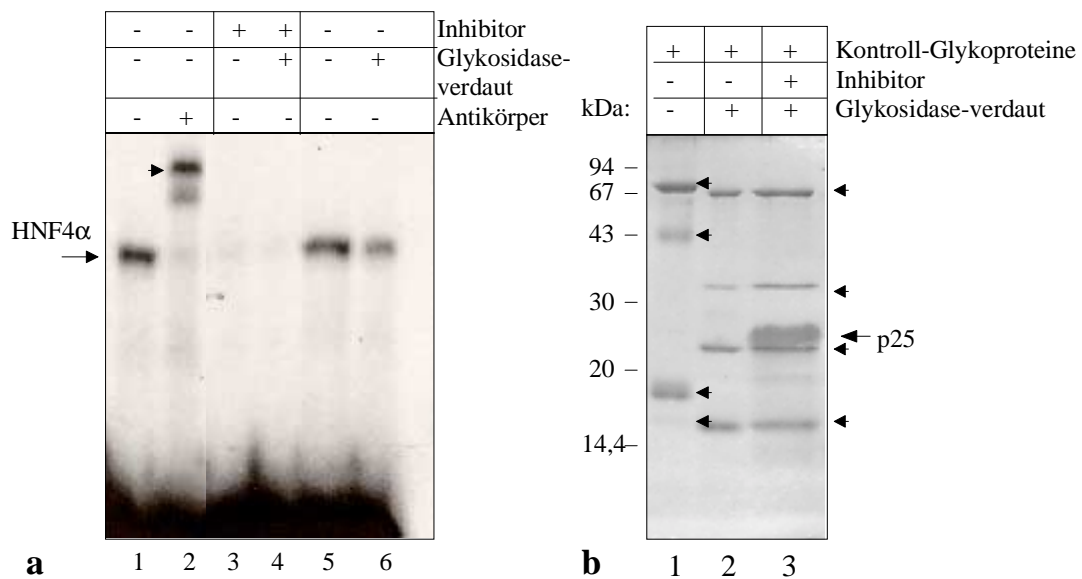


Abb. 7: Hemmaktivität des HNF4-Inhibitors nach Verdau mit N-Glykosidase F

a) Gelretardationsanalyse von mit N-Glykosidase F verdaulichem HNF4-Inhibitor. Zu Gelretardationsansätzen mit Leberkernextrakt und einem markierten Oligonukleotid mit HNF4-Bindestelle wurden wie angegeben glykosidaseverdaute bzw. unverdaute MonoQ-Inhibitorfraktion oder Leeransätze gegeben. Der HNF4 α -DNA-Komplex und der durch den Antikörper 66II (Ak) im Gel weiter retardierte Komplex (Pfeilspitze) sind markiert.

b) Kontrolle des Glykosidase-Verdau. Auf ein 15% SDS-Proteingel wurden Kontroll-Glykoproteine vor (Bahn 1) und nach einem Verdau mit N-Glykosidase F (Bahnen 2, 3) aufgetragen; die Probe in Bahn 3 wurde vor dem Verdau mit 2 μ l einer MonoQ-Inhibitorfraktion versetzt. Die Molekulargewichte von Markerproteinen und die Position des 25 kDa-Proteins aus der MonoQ-Fraktion sind angegeben, die Positionen der Kontroll-Glykoproteine durch Pfeilspitzen gekennzeichnet.

N-Glykosidase F trennt Zuckereinheiten als Ganzes von Proteinen ab, sollte also die Hemmaktivität des HNF4-Inhibitors nicht zerstören, falls sie von einem Zuckeranteil ausgeübt würde. In diesem Fall hätte der Inhibitor nach Inkubation mit Glykosidase eine höhere Gelmobilität, da dann, wie nach einem Verdau mit Proteasen, der Proteinanteil fehlen würde.

Um die Gelmobilität zu überprüfen, wurde mit Glykosidase behandelter und unbehandelter Inhibitor in einem modifizierten Proteingel nach Schägger aufgetrennt, das eine besonders gute Auftrennung von Substanzen kleinerer Molekulargewichte erlaubt (Schägger und von Jagow, 1987). Die Hemmaktivität wurde nach einer Elution aus dem Proteingel (vgl. 1.2) durch Einsatz der erhaltenen Fraktionen in eine Gelretardationsanalyse lokalisiert (Abb. 8). Die stärkste Hemmaktivität findet sich vor wie nach der Inkubation mit Glykosidase in der gleichen Fraktion (Bahn 7). Die umgebenden Fraktionen hemmen ebenfalls die HNF4 α -DNA-Bindung partiell, der Inhibitor läuft also auch hier, wie schon im herkömmlichen SDS-Proteingel (Abb. 3) nicht in einer definierten scharfen Bande.

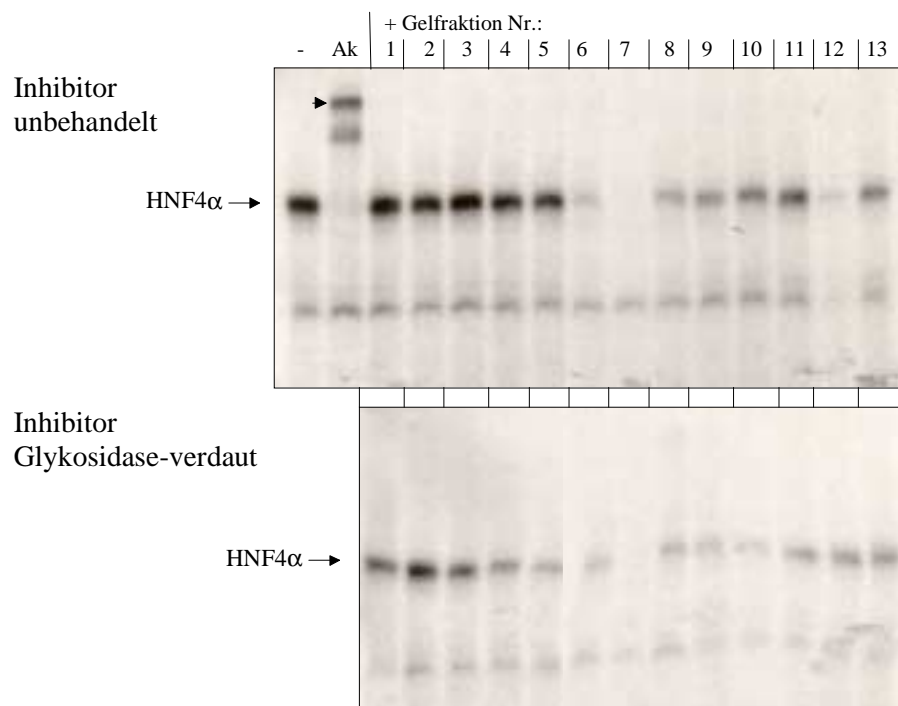


Abb. 8: Gelmobilität des HNF4-Inhibitors nach Verdau mit N-Glykosidase F

Gelretardationsanalyse zur Lokalisierung der Hemmaktivität in einem SDS-Proteingel vor (oben) und nach (unten) Inkubation mit N-Glykosidase F. Unbehandelter und glykosidase-behandelter Inhibitor wurde in einem SDS-Proteingel nach Schägger et al. (1987) aufgetrennt, die Bahnen in Stücke geschnitten, in den Stücken enthaltenen Substanzen eluiert, ausgefällt und in H₂O aufgenommen. Je 1 μ l der erhaltenen Fraktionen wurden zu Gelretardationsansätzen mit Leberkernextrakt und einer markierten HNF4-Bindestelle gegeben. Die Position des HNF4 α -DNA-Komplexes ist angegeben, der durch den HNF4-spezifischen Antikörper 66II (Ak) weiter im Gel retardierte Komplex durch eine Pfeilspitze markiert.

Da sowohl die Hemmaktivität als auch die Mobilität des HNF4-Inhibitors in einem SDS-Proteingel unbeeinflusst von einer Inkubation mit N-Glykosidase F sind, ist der Inhibitor kein Glykoprotein mit N-glykosidisch gebundenem und inhibitorisch wirksamem Zucker.

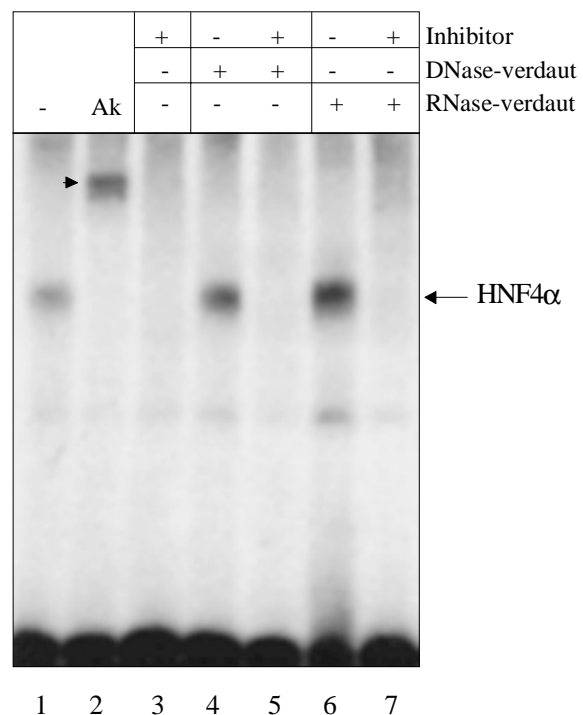
1.6 Die inhibitorische Aktivität ist nukleaseresistent

Die Inhibition der HNF4 α -DNA-Bindung könnte darauf beruhen, dass der Inhibitor einen Nukleinsäure-Anteil enthält, der an HNF4 α bindet und so mit dem in den Gelretardationsanalysen eingesetzten 32 P-markierten Oligonukleotid um die Bindung an HNF4 α kompetiert. Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurde HNF4-Inhibitor mit Nukleasen inkubiert und dann in Gelretardationsansätzen auf seine Hemmaktivität untersucht.

Nach Verdau mit DNase I wurde die DNase durch Erhitzen inaktiviert, so dass sie das markierte Oligonukleotid im Gelretardationsansatz nicht angreift (Abb. 9, Bahn 4). Der HNF4-Inhibitor zeigt nach der Inkubation mit DNase unverminderte Hemmaktivität (Bahn 5). Der DNase-Verdau wurde durch Inkubation eines Plasmids in einem Parallelansatz kontrolliert. Das Plasmid war nach dem Verdau im Agarosegel nicht mehr nachzuweisen (Daten nicht gezeigt).

Abb. 9: Hemmaktivität des HNF4-Inhibitors nach Inkubation mit DNase und RNase

Je 1 μ l einer MonoQ-Inhibitorfraktion oder H₂O wurden in 10 μ l-Ansätzen mit DNase oder RNase inkubiert. Zu Gelretardationsansätzen mit Leberkernextrakt und markierter HNF4-Bindestelle wurden wie angegeben 1 μ l MonoQ-Inhibitorfraktion (1:10 verdünnt) oder 1 μ l der nukleasebehandelten Präparationen eingesetzt. Die Position des HNF4 α -DNA-Komplexes ist angezeigt, der durch den Antikörper 66II (Ak) weiter retardierte Komplex durch eine Pfeilspitze markiert.



Die Zugabe eines RNase-haltigen Ansatzes zum Gelretardationsexperiment beeinträchtigt die HNF4 α -DNA-Bindung nicht (Bahn 6). Der HNF4-Inhibitor hemmt nach Inkubation mit RNase die HNF4 α -DNA-Bindung weiterhin (Bahn 7). Die Aktivität der RNase in den Ansätzen wurde durch Verdau einer *in vitro* synthetisierten mRNA nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

Da weder DNase- noch RNase-Behandlung die Hemmaktivität des HNF4-Inhibitors aufheben, wird diese Aktivität nicht durch eine Nukleinsäure ausgeübt.

1.7 Der HNF4-Inhibitor ist kein Zink-Chelator

HNF4 α ist ein Zinkfingerprotein und benötigt Zink-Ionen zur Bindung an DNA. Der Inhibitor könnte daher durch Abfangen von Zinkionen aus der Lösung auf die HNF4 α -DNA-Bindung wirken. In diesem Fall müsste die inhibitorische Wirkung durch Zugabe von Zinkionen zu den Gelretardationsansätzen aufzuheben sein.

Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurde ZnSO₄ zu Gelretardationsansätzen gegeben. Die Zugabe von ZnSO₄ auf Endkonzentrationen von 0,01 und 0,1 mM beeinflusst die HNF4 α -DNA-Bindung nicht (Abb. 10, vgl. Bahnen 3 und 4 mit Bahn 1). Eine Konzentration von 1 mM ZnSO₄ dagegen verhindert die Bindung von HNF4 α an DNA (Bahn 5).

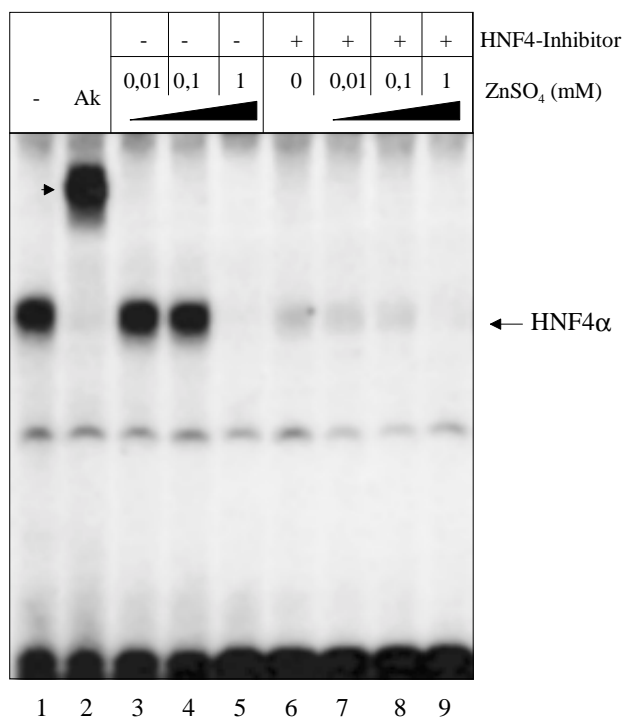


Abb. 10: Hemmaktivität des HNF4-Inhibitors in Anwesenheit von Zn²⁺

Zu Gelretardationsansätzen mit Leberkernextrakt und markierter HNF4-Bindestelle wurde je 1 μ l einer ZnSO₄-Lösung auf die angegebenen Endkonzentrationen gegeben. In den Bahnen 6-9 wurden außerdem je 1 μ l einer 1:80 verdünnten MonoQ-Inhibitorfraktion zugesetzt. Die Position des HNF4 α -DNA-Komplexes ist angegeben, der durch den Antikörper 66II (Ak) im Gel weiter retardierte Komplex durch eine Pfeilspitze markiert.

Um auch einen schwachen Effekt von Zink auf die Inhibitorwirkung detektieren zu können, wurde HNF4-Inhibitor so stark verdünnt eingesetzt, dass die HNF4 α -DNA-Bindung nur partiell gehemmt wird (Bahn 6). Bei Zinkkonzentrationen von 0,01 und 0,1 mM ist die Inhibition der DNA-Bindung durch HNF4-Inhibitor gleich stark wie ohne zugesetztes ZnSO₄ (vgl. Bahn 7 und 8 mit Bahn 6). Wenn der Inhibitor durch Wegfangen von Zinkionen wirken sollte, würde man erwarten, dass er die Hemmwirkung von 1 mM ZnSO₄ auf die HNF4 α -DNA-Bindung aufheben kann. Das ist aber nicht der Fall, sondern mit 1 mM ZnSO₄ und Inhibitor ist weiterhin keine HNF4 α -DNA-Bindung nachweisbar (Bahn 9).

Der Zusatz von ZnCl₂ in einer Endkonzentration von bis zu 6 mM zu Gelretardationsansätzen beeinflusste die Inhibitorwirkung ebenfalls nicht (Daten nicht gezeigt). Der HNF4-Inhibitor wirkt daher nicht als Zink-Chelator.

2. Durch HPLC oder nach Pronaseverdau kann der HNF4-Inhibitor weiter aufgereinigt werden

Zur strukturellen wie funktionellen Analyse des HNF4-Inhibitors ist eine weitere Aufreinigung erforderlich, da in den MonoQ-Fractionen zumindest noch verunreinigende Proteine (vgl. Abb. 2c) enthalten sind.

2.1 Durch reversed phase-HPLC kann HNF4-Inhibitor in analytischem Maßstab weiter aufgereinigt werden

Ein erster Ansatz zur weiteren Aufreinigung waren Versuche, den Inhibitor mittels reversed phase-HPLC von anderen Bestandteilen der MonoQ-Präparation zu trennen (durchgeführt von Dr. Kai Krüger, Institut für Zellbiologie, Universitätsklinikum Essen). Direkt aus einer Fraktion der MonoQ-Aufreinigung (vgl. 1.1) gelang eine solche HPLC-Aufreinigung des HNF4-Inhibitors nicht, vielmehr wurde so keine Auftrennung der Bestandteile in klar definierte Peaks des Elutionsspektrums erreicht (nicht gezeigt).

Daher wurde zur Aufreinigung des HNF4-Inhibitors von Proteinen und eventuell vorhandenen anderen Fremdstoffen eine MonoQ-Präparation in einem SDS-Proteingel auf-

getrennt und der Inhibitor aus dem Gel eluiert. Die nachfolgende HPLC-Chromatographie des geleluierten Inhibitors ergab eine saubere Auftrennung einzelner Komponenten (Abb. 11a). Die inhibitorische Aktivität konnte im Gelretardationsexperiment (nicht gezeigt) auf Fraktion 12 lokalisiert werden. Sie kann damit einem einzelnen Peak im Elutionsprofil zugeordnet werden, was auf eine homogene Fraktion hinweist.

Das Absorptionsspektrum dieser Fraktion ist in Abb. 11b dargestellt. Es besitzt innerhalb der Wellenlängen von 200 bis 340 nm ein absolutes Maximum bei 214,2 nm und ein lokales Maximum bei 281,4 nm.

Im Massenspektrometer konnte die Substanz in dieser Fraktion nicht detektiert werden. Dabei konnte nicht geklärt werden, ob zu wenig Material in ihr enthalten war oder ob die Einstellungen des Spektrometers für die unbekannte Substanz nicht optimal waren (Zusammenarbeit mit Dr. H. Prinz, Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie, Dortmund).

Die gezeigte HPLC-Aufreinigung war nur in dem beschriebenen analytischen Maßstab möglich. In einem präparativen größeren Ansatz wurde keine Auftrennung erreicht, möglicherweise durch zu hohe SDS-Konzentrationen aus der Gelelution. Damit war es nicht möglich, auf diese Weise genügend Material für weitere Strukturanalysen aufzureinigen.

2.2 Der Inhibitor kann nach Verdau mit Pronase mit Phenol/Chloroform extrahiert und ausgefällt werden

Da MonoQ-Fractionen des HNF4-Inhibitors gar nicht und geleluierter Inhibitor nur in geringen Mengen durch HPLC weiter aufgereinigt werden können, müssen andere Wege gefunden werden, den Inhibitor von anderen Bestandteilen der MonoQ-Fraktion abzutrennen. Einen Ansatzpunkt dazu bietet die Möglichkeit, Inhibitor mit Pronase zu verdauen (vgl. 1.3). Auf diese Weise könnte eine proteinfreie Präparation des inhibitorisch wirksamen Teils des HNF4-Inhibitors gelingen, die chemische Analysen ermöglichen und funktionelle Analysen eindeutiger machen könnte. Voraussetzung dafür ist, dass sich die Pronase wieder aus dem Verdau entfernen lässt.

Zur Entfernung proteaseresistenter Peptide aus dem Pronaseverdau bietet sich eine Extraktion mit Phenol und Chloroform an. Nach einer Phenol/Chloroform-Extraktion

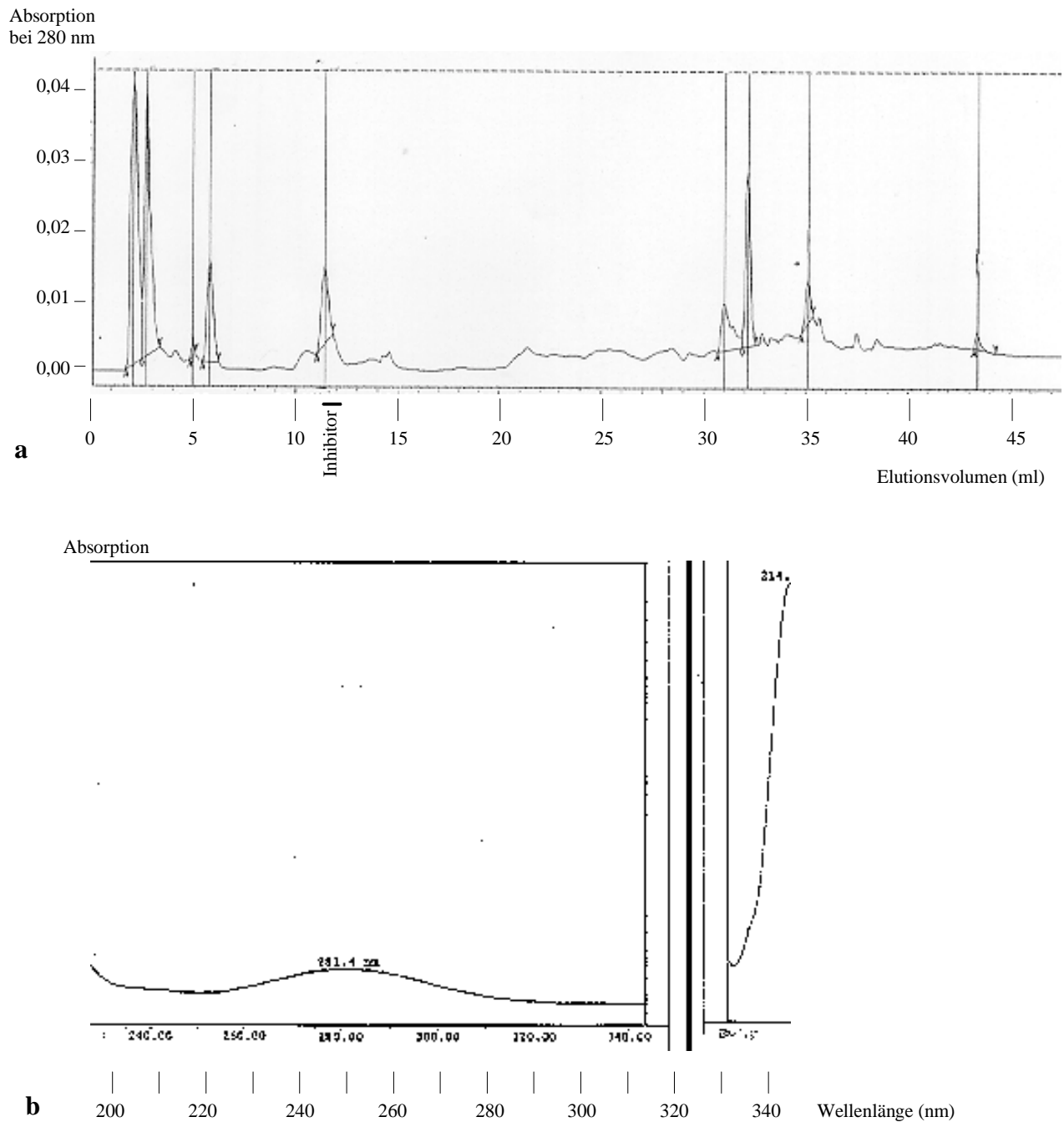


Abb. 11: Aufreinigung des HNF4-Inhibitors mittels reversed phase-HPLC

a) Elutionsprofil (Absorption des Eluats bei 280 nm) von einer reversed phase-HPLC-Säule (Nova-Pak C₁₈, Waters). 250 µl einer MonoQ-Inhibitorfraktion wurden durch Ultrafiltration eingengt, in einem SDS-Proteingel aufgetrennt und der HNF4-Inhibitor aus dem Gel eluiert. Das Eluat wurde eingengt und in einer reversed-phase HPLC-Säule aufgetrennt. Der HNF4-Inhibitor eluiert zwischen 11 und 12 ml (markiert).

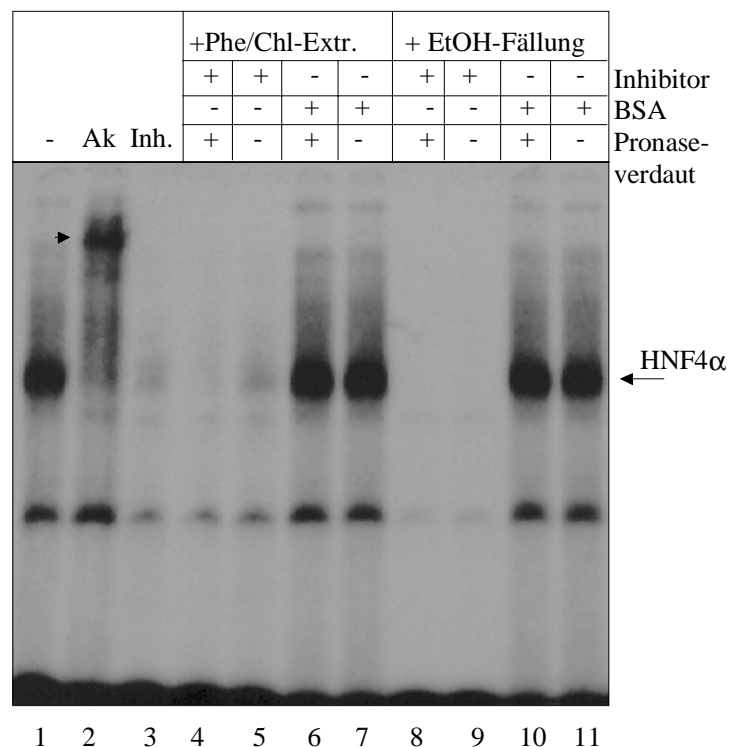
b) Absorptionsspektrum der HPLC-Fraktion, die den HNF4-Inhibitor enthält, bei Wellenlängen von 200 bis 340 nm.

bleibt Pronase-verdauter ebenso wie unbehandelter Inhibitor in der wässrigen Phase (Abb. 12, Bahnen 4 und 5). Die organische Phase enthält dagegen keine inhibitorische Aktivität (nicht gezeigt). Dass die Hemmung der HNF4 α -DNA-Bindung nicht auf Substanzen aus der Phenol/Chloroform-Extraktion zurückgeht, zeigt ein Phenol/Chloroform-extrahierter Kontrollansatz (BSA-Lösung), der die HNF4 α -DNA-Bindung nicht hemmt (Bahnen 6, 7). Aus der wässrigen Phase lassen sich HNF4-Inhibitor und sein pronaseresistentes Fragment mit Ethanol ausfällen (Bahnen 8 und 9). Dies ermöglicht ein Auswaschen von Salzen und eine Konzentrierung des Inhibitors. Auf diese Weise kann eine proteinfreie Präparation des proteaseresistenten Teils des Inhibitors gewonnen werden, die für weitere chemische und funktionelle Analysen genutzt werden kann.

Außerdem kann ein weiterer Aufreinigungsschritt eingefügt werden, da sich der protease-resistente Teil nach der Phenol-Chloroform-Extraktion durch MonoQ-Chromatographie aufreinigen lässt. Das Elutionsprofil (Abb. 13) zeigt nur noch einen Peak an eluiertem Material, das bei 280 nm absorbiert und mit der inhibitorischen Aktivität zusammenläuft. Die inhibitorische Aktivität eluiert von der MonoQ-Säule bei etwa gleichen Salzkonzentrationen (400-500 mM NaCl) wie der unverdaute Inhibitor (vgl. 1.1).

Abb. 12: Isolierung des protease-resistenten Teils des HNF4-Inhibitors

Ein Aliquot einer MonoQ-Inhibitorpräparation und einer BSA-Lösung wurde unbehandelt oder nach Pronaseverdau mit Phenol/Chloroform extrahiert, mit Ethanol aus der wässrigen Phase ausgefällt und in H₂O wiederaufgenommen. Je 1 μ l der wässrigen Phase der Extraktion (Phe/Chl-Extr.) und der Fällung (EtOH-Fällung) wurden wie angegeben zu Gelretardationsansätzen mit Leberkernextrakt und markierter HNF4-Bindestelle zugesetzt. Der mit HNF4 α bezeichnete Pfeil zeigt auf den HNF4 α -DNA-Komplex, die Pfeilspitze markiert den durch den HNF4-spezifischen Antikörper 66II (Ak) weiter im Gel retardierten Komplex.



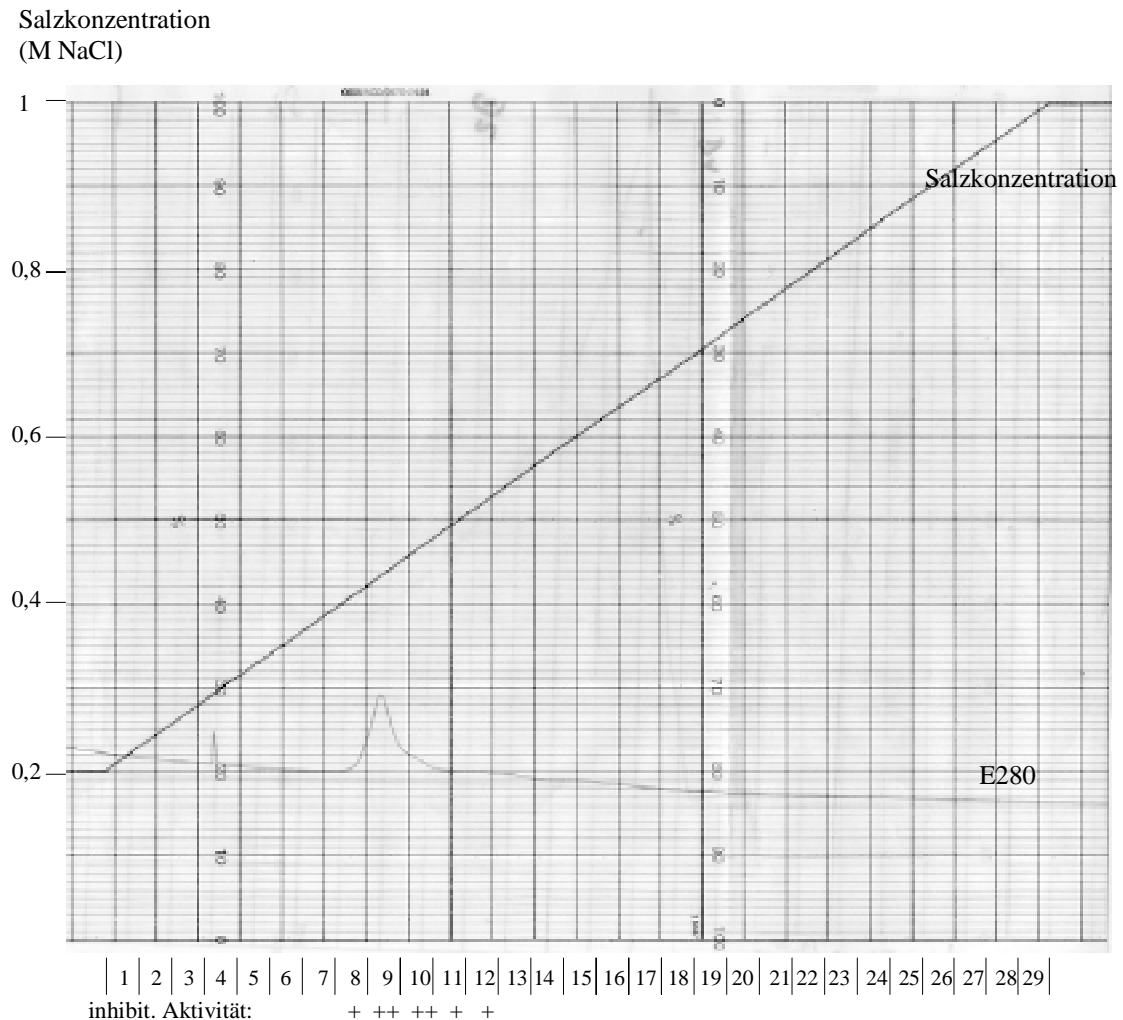


Abb. 13: Elutionsprofil des pronaseresistenten Inhibitorfragmentes von einer MonoQ-Anionenaustauschersäule

Eine MonoQ-Inhibitorpräparation aus 5000 *Xenopus*-Eiern wurde mit Pronase verdaut und mit Phenol/Chloroform extrahiert. Die wässrige Phase wurde durch MonoQ-Anionenaustauschchromatographie aufgetrennt. Dargestellt ist die Absorption bei 280 nm (E280) des Eluats von der MonoQ-Säule bei einer Gradientenelution von 0,2 M bis 1 M NaCl. Die inhibitorische Aktivität in den Fraktionen wurde durch Gelretardationsanalyse bestimmt und ist folgendermaßen angegeben: Die DNA-Bindung von 0,3 µl Leberkernextrakt wird durch 1 µl (+) bzw. durch 0,1 µl (++) der MonoQ-Fraktion gehemmt. Der kleine, scharfe Peak in Fraktion 4 ist wahrscheinlich auf eine Luftblase im System zurückzuführen.

3. Der HNF4-Inhibitor ist kein Ligand von HNF4 α

Die starke Konservierung der Ligandenbindungsdomäne von HNF4 α im Vergleich zu dem ligandenaktivierten Retinsäurerezeptor RXR (vgl. Einleitung) lässt vermuten, dass auch HNF4 α durch einen Liganden reguliert werden könnte. Im Folgenden sollte daher untersucht werden, ob der HNF4-Inhibitor als Ligand auf HNF4 α wirken könnte.

3.1 Der HNF4-Inhibitor unterscheidet sich von Acyl-Coenzym A-Thioestern, die als Liganden für HNF4 α vorgeschlagen worden sind

Acyl-CoenzymA(CoA)-Thioester sind als Liganden für HNF4 α vorgeschlagen worden (Hertz et al., 1998). In dieser Veröffentlichung wurde gezeigt, dass Acyl-CoA-Verbindungen auch die HNF4 α -DNA-Bindung in Gelretardationsexperimenten beeinflussen: Verbindungen mit kurzkettigen Fettsäuren (C14, C16) verstärken die Bindung, solche mit langkettigen Fettsäuren (C18, C20) dagegen hemmen sie.

Um zu überprüfen, ob der HNF4-Inhibitor aus *Xenopus*-Eiextrakten wie eine der publizierten Acyl-CoA-Verbindungen auf HNF4 α wirken könnte, habe ich die Hemmeigenschaften von Inhibitor und verschiedenen Acyl-CoA-Thioestern (C14:0-, C16:0-, C18:0-CoA) in einer Gelretardationsanalyse miteinander verglichen (Abb. 14).

Palmitoyl-CoA (C16:0-CoA) hemmt in einer Endkonzentration von 10 μ M die Bindung von HNF4 α aus einem Leberkernextrakt an sein Erkennungselement (Abb. 14a, Bahn 5). Eine Konzentration von 5 μ M hemmt die Bindung noch partiell (Bahn 6), während niedrigere Konzentrationen die HNF4 α -DNA-Bindung nicht mehr beeinträchtigen (Bahnen 7 und 8). Die Hemmung ist allerdings nicht spezifisch für HNF4 α , da die DNA-Bindung von HNF1 α aus dem Leberkernextrakt ebenfalls bei einer Endkonzentration von 10 μ M Palmitoyl-CoA gehemmt wird (Bahn 9).

Der HNF4-Inhibitor, in gleichen Verdünnungsstufen (0,1 bis 0,0125 μ l) eingesetzt, inhibiert dagegen die HNF4 α -DNA-Bindung (Bahnen 13-16), nicht aber die HNF1 α -Bindung (Bahn 17-20). Der HNF4-Inhibitor hemmt somit über einen weiten Konzentrationsbereich spezifisch die HNF4 α -Bindung, während Palmitoyl-CoA die DNA-Bindung der verschiedenen, nicht miteinander verwandten Transkriptionsfaktoren HNF4 α und HNF1 α gleichermaßen beeinträchtigt.

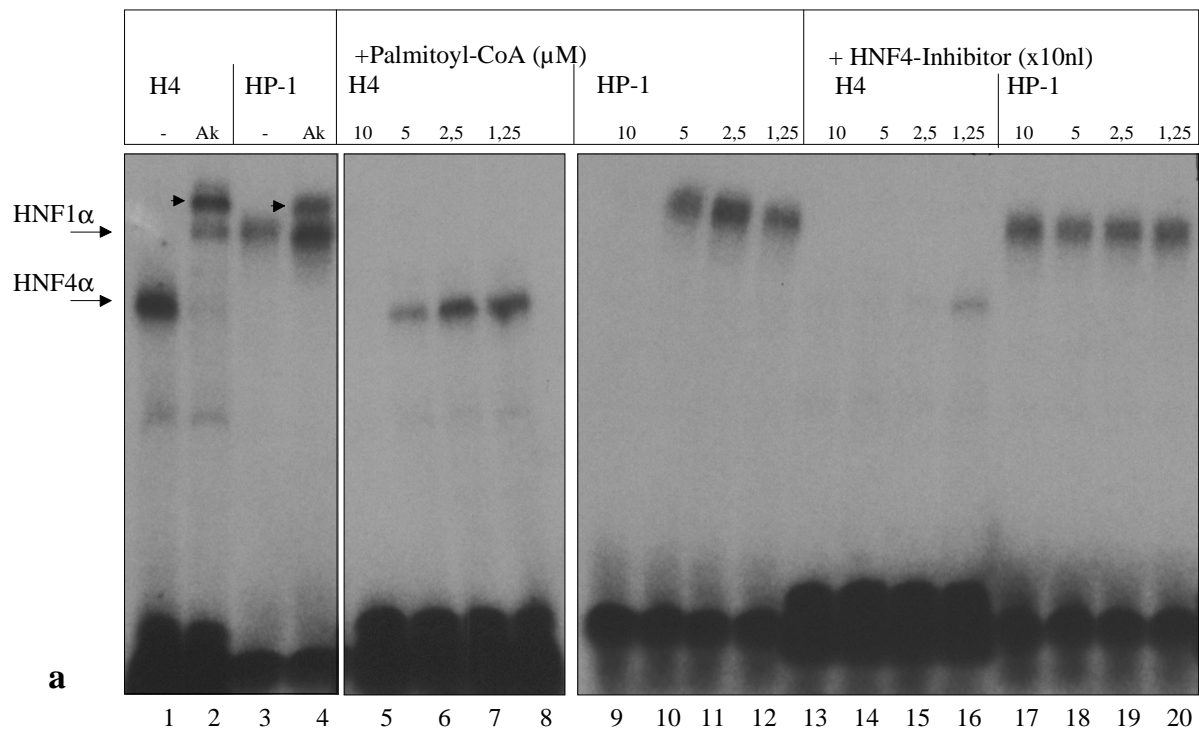
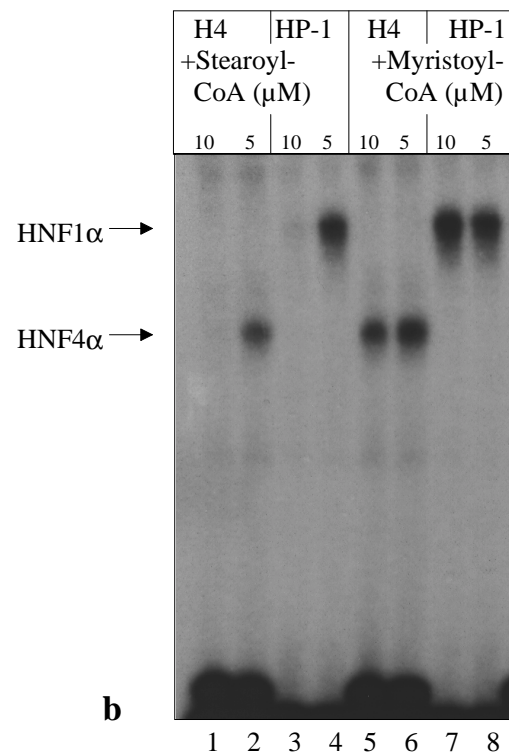


Abb. 14: Vergleich der Spezifität der HNF4-Inhibition durch HNF4-Inhibitor und verschiedene Acyl-CoenzymA-Thioester

a) Vergleich der Hemmaktivität von Palmitoyl-CoA mit der des HNF4-Inhibitors. Zu Gelretardationsansätzen mit Leberkernextrakt und einer markierten HNF4- bzw. HNF1-Bindestelle (H4 bzw. HP-1) wurden je 1 μl Palmitoyl-CoA in den angegebenen Endkonzentrationen (Bahnen 5-12) oder MonoQ-Inhibitorpräparation in den angegebenen Volumina (Bahnen 13-20) zugegeben. Die Positionen des HNF4α-DNA- und des HNF1α-DNA-Komplexes sind angegeben, die durch Zugabe des HNF4-spezifischen Antikörpers 66II bzw. des HNF1α-spezifischen Antikörpers RAD1 (Ak) weiter retardierten Komplexe sind durch Pfeilspitzen markiert.

b) Hemmaktivität von Stearoyl- und Myristoyl-CoA auf die DNA-Bindung von HNF4α bzw. HNF1α. Zu Gelretardationsansätzen wie in a) wurden Stearoyl- bzw. Myristoyl-CoA in den angegebenen Endkonzentrationen gegeben.



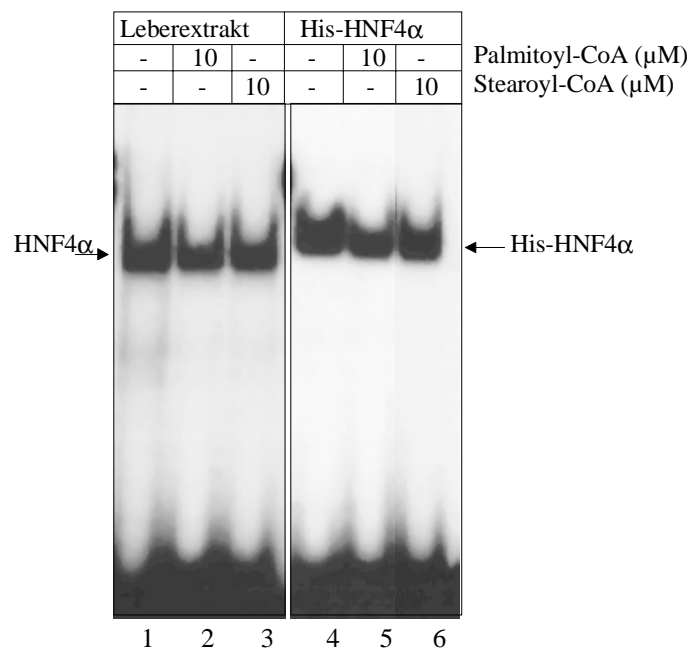
Stearoyl-CoA (C18:0-CoA) hemmt in einer Konzentration von 10 μM ebenfalls die HNF4 α - und die HNF1 α -Bindung des Leberkernextraktes (Abb. 14b, Bahn 1 und 3), während 5 μM keine Hemmung mehr zeigen (Bahnen 2 und 4). Myristoyl-CoA (C14:0-CoA) zeigt in Konzentrationen von 10 und 5 μM keinen Einfluss auf die DNA-Bindung beider Faktoren (Abb. 14b, Bahn 5-8).

Da der HNF4-Inhibitor spezifisch HNF4 α hemmt, wirkt er nicht auf gleiche Weise wie eine der untersuchten Acyl-CoA-Verbindungen, die unter denselben Reaktionsbedingungen auf HNF4 α und auf HNF1 α gleichermaßen wirken.

Unter den hier verwendeten Reaktionsbedingungen verstärken Acyl-CoA-Thioester mit kurzkettigen Fettsäuren die HNF4 α -DNA-Bindung nicht, wie von Hertz et al. (1998) berichtet. Die Reaktionsbedingungen unterscheiden sich vor allem in der Zusammensetzung der Puffer für die Gelretardationsansätze und für die Elektrophorese. Ich habe daher das Gelretardationsexperiment unter den experimentellen Bedingungen von Hertz et al. (1998) wiederholt (Abb. 15). Die DNA-Bindung von HNF4 α aus Leberkernextrakt wird weder durch das „kurzkettige“ Palmitoyl-CoA (Abb. 15, Bahn 2) noch durch das „langkettige“ Stearoyl-CoA (Bahn 3) beeinflusst. Auch die DNA-Bindung eines rekombinant hergestellten, His-getaggten HNF4 α (Bahn 4, 6), wie es von Hertz et al. (1998) verwendet worden war, wird durch Palmitoyl-CoA (Bahn 5) oder Stearoyl-CoA (Bahn 7) nicht verstärkt.

Abb. 15: HNF4 α -DNA-Bindung mit Acyl-CoA-Verbindungen unter den experimentellen Bedingungen von Hertz et al. (1998)

Ratten-Leberkernextrakt (Bahnen 1-3) und im Baculovirussystem hergestelltes His-getaggt HNF4 α (His-HNF4 α , Bahnen 4-6) wurden mit der markierten HNF4-Bindestelle des *Xenopus*-HNF1 α -Promotors in Bindepuffer nach Hertz et al. (1998) inkubiert. Zu den Gelretardationsansätzen wurden wie angegeben Palmitoyl-(C16:0-)CoA oder Stearoyl-(C18:0-)CoA zugesetzt. Die Gelelektrophorese wurde nach Hertz et al. (1998) durchgeführt. Die Positionen der Protein-DNA-Komplexe sind angegeben.

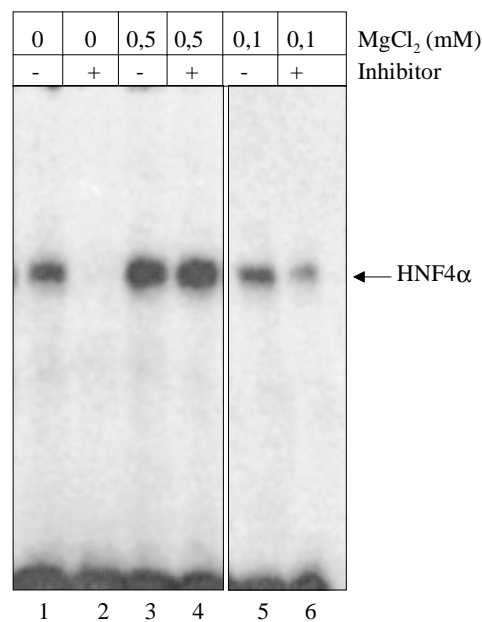


Unter den experimentellen Bedingungen von Hertz et al. (1998) hemmt der HNF4-Inhibitor die HNF4 α -DNA-Bindung nicht mehr (Daten nicht gezeigt). Dieser Befund konnte auf das Vorhandensein von Magnesiumionen im Bindepuffer zurückgeführt werden (Abb. 16). Führt man die Gelretardation in Bindepuffer (GRBB) ohne EDTA aus, hemmt der Inhibitor die HNF4 α -DNA-Bindung (vgl. Bahn 2 mit Bahn 1). Gibt man MgCl_2 auf eine Endkonzentration von 0,5 mM dazu, kann der Inhibitor die DNA-Bindung nicht mehr hemmen (vgl. Bahn 4 mit Bahn 3). Bei einer MgCl_2 -Konzentration von 0,1 mM wird die DNA-Bindung durch Inhibitor noch partiell gehemmt (vgl. Bahn 6 mit Bahn 5).

Mg^{2+} inaktiviert also den HNF4-Inhibitor. Es hat jedoch keine irreversible Wirkung auf den Inhibitor, da er nach Inkubation mit MgCl_2 und Mischen mit EDTA wieder volle Hemmaktivität besitzt (Daten nicht gezeigt).

Abb. 16: Einfluss von MgCl_2 auf die Hemmwirkung des HNF4-Inhibitors

Eine Gelretardationsanalyse mit Leberkernextrakt und markierter HNF4-Bindestelle wurde in Bindepuffer ohne EDTA durchgeführt. Wie angegeben wurde 0,1 μl einer MonoQ-Inhibitorpräparation und MgCl_2 in den angegebenen Endkonzentrationen zu den Ansätzen gegeben. Die Position des HNF4 α -DNA-Komplexes ist markiert.



3.2 Eine partielle Proteolyse von HNF4 α mit und ohne HNF4-Inhibitor gibt keinen Hinweis auf eine ligandenähnliche Bindung des Inhibitors

Liganden des mit HNF4 α nahe verwandten Retinsäurerezeptors sowie anderer Kernrezeptoren verändern durch ihre Bindung in der Ligandenbindungsdomäne die Konformation der Kernrezeptoren. Diese Konformationsänderungen können u.a. durch partielle Proteolyse von ligandenbeladenen Kernrezeptoren nachgewiesen werden, da diese gegenüber dem Apoprotein eine erhöhte Proteaseresistenz aufweisen (Leng et al. 1993, Zeng et

al. 1994). Falls der Inhibitor als Ligand an HNF4 α bindet, sollte seine Bindung ähnliche Konformationsänderungen in HNF4 α induzieren, wie es für die Bindung von Liganden an andere Kernrezeptoren gezeigt wurde.

Für eine partielle Proteolyse von HNF4 α wurde *in vitro* im Reticulocytenlysat synthetisiertes *Xenopus*-HNF4 α verwendet. Zunächst wurde im Gelretardationsexperiment untersucht, ob und wie stark das *in vitro* hergestellte Protein durch Inhibitor hemmbar ist (Abb. 17). Die DNA-Bindung von 2 μ l *in vitro* synthetisiertem HNF4 α lässt sich durch Zugabe von 1 μ l einer MonoQ-Inhibitorfraktion hemmen (Bahn 4), während 0,1 μ l nicht ausreichen (Bahn 3). Die wesentlich stärkere Bindung von *in vitro* synthetisiertem Ratten-HNF1 α (Bahn 5) wird durch 0,1 μ l Inhibitor nicht beeinflusst (Bahn 7), durch 1 μ l Inhibitor jedoch abgeschwächt (Bahn 8).

Um eine mögliche veränderte Proteaseresistenz von HNF4 α mit Inhibitor zu überprüfen, wurde *in vitro* synthetisiertes, 35 S-markiertes *Xenopus*-HNF4 α ohne Inhibitor oder mit einer Inhibitormenge, die seine DNA-Bindung im Gelretardationsversuch hemmen würde, vorinkubiert. Dann wurden die Ansätze mit verschiedenen Konzentrationen an Trypsin inkubiert, in einem SDS-Proteingel aufgetrennt und die erhaltenen HNF4 α -Fragmente durch Exposition eines Films detektiert (Abb. 18).

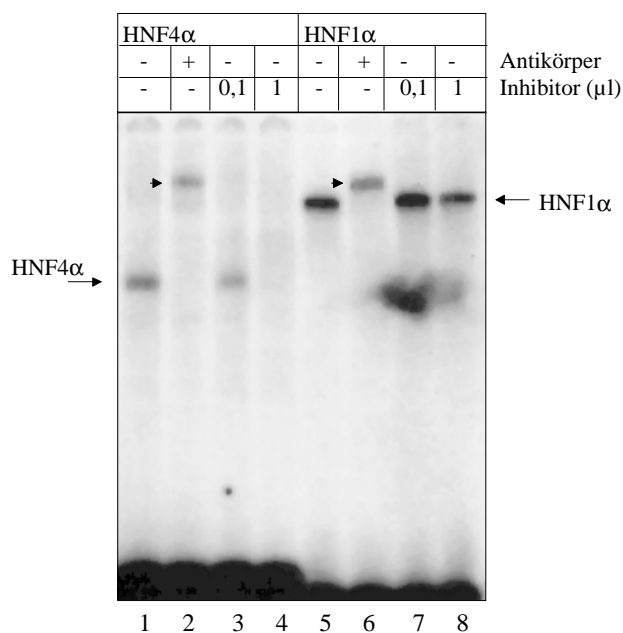


Abb. 17: Hemmbarkeit von *in vitro* synthetisiertem HNF4 α durch HNF4-Inhibitor

In vitro synthetisiertes *Xenopus*-HNF4 α (2 μ l) bzw. Ratten-HNF1 α (1 μ l) wurde in Gelretardationsansätze mit markierter HNF4- bzw. HNF1-Bindestelle eingesetzt. Zu den Ansätzen wurden wie angegeben der HNF4-spezifische Antikörper 66II bzw. der HNF1-spezifische Antikörper RAD1 oder MonoQ-Inhibitorfraktion gegeben. Die Protein-DNA-Komplexe sind markiert, die durch die Antikörper weiter im Gel retardierten Komplexe durch Pfeilspitzen gekennzeichnet.

HNF4 α , das ohne Inhibitor vorinkubiert wurde, hinterlässt nach Verdau mit 50 $\mu\text{g/ml}$ Trypsin zwei proteaseresistente Banden (Bahn 3, Pfeilspitzen), mit 100 $\mu\text{g/ml}$ ist die untere der beiden Banden noch schwach vorhanden (nicht sichtbar in Abb. 18), und mit 200 $\mu\text{g/ml}$ Trypsin sind keine Proteinbanden mehr nachzuweisen (Bahn 5). Nach Vorinkubation des HNF4 α mit MonoQ-Inhibitorpräparation verändert sich dieses Muster nicht (vgl. Bahn 6-8 mit Bahn 3-5). Die untere der beiden proteaseresistenten Banden war nach einem Verdau mit 100 $\mu\text{g/ml}$ Trypsin auch in anderen Versuchsansätzen noch zu sehen (nicht gezeigt), so dass ein Unterschied in der Proteaseresistenz der Fragmente in diesem Konzentrationsbereich nachweisbar sein müsste.

Der Inhibitor induziert also keine Konformationsänderung in HNF4 α , die in der Veränderung des Musters proteaseresistenter Fragmente resultieren würde.

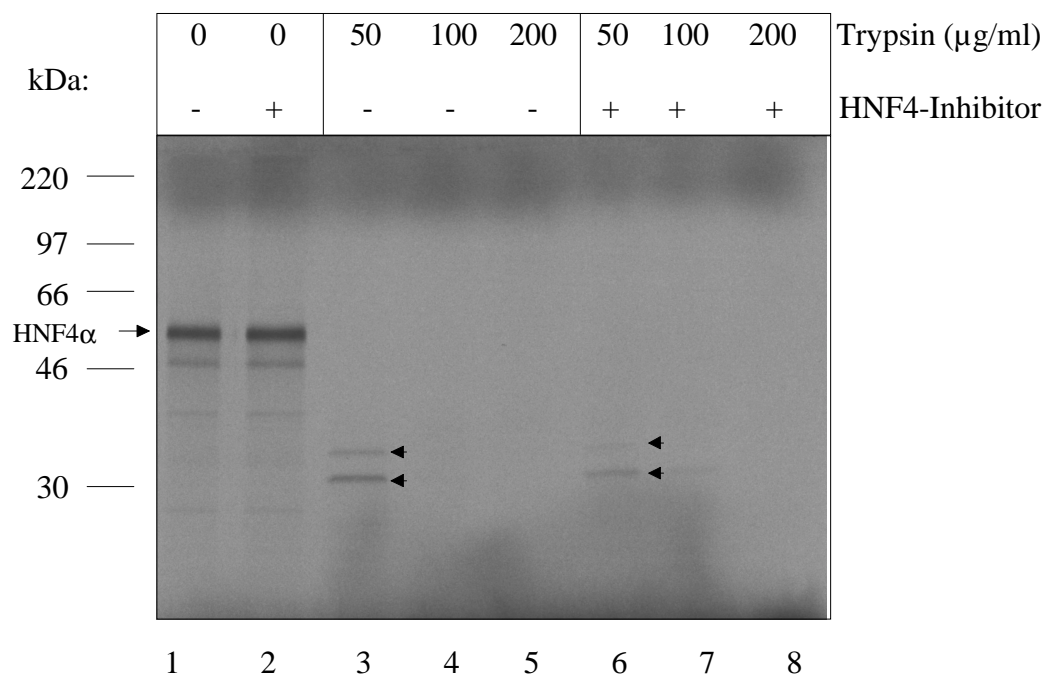


Abb. 18: Partielle Proteolyse von HNF4 α mit und ohne HNF4-Inhibitor

In vitro synthetisiertes, ^{35}S -markiertes *Xenopus*-HNF4 α (1 μl 5:8 verdünnt) wurde nach Vorinkubation mit oder ohne HNF4-Inhibitor (0,5 μl einer 10fach konzentrierten MonoQ-Fraktion) mit Trypsin in den angegebenen Endkonzentrationen inkubiert. Die Ansätze wurden in einem 10% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, das Gel getrocknet und ein Biomax-Film (Kodak) 1 d damit exponiert. Die Molekulargewichte mitgelaufener Markerproteine in kDa sind angegeben. Die Position des HNF4 α -Proteins ist markiert, trypsinresistente Peptide sind mit Pfeilspitzen gekennzeichnet.

3.3 Die Ligandenbindungsdomäne von HNF4 α ist nicht nötig für die Inhibierbarkeit der HNF4 α -DNA-Bindung

Zur Klärung der Frage, ob der HNF4-Inhibitor als Ligand von HNF4 α wirkt, wurde die Hemmbarkeit des HNF4 α -Konstruktes Mt-HNF4 Δ EF überprüft, dem die Ligandenbindungsdomäne (E) und die F-Domäne fehlen (Abb. 19a). Dazu wurde ein Kernextrakt aus mit dem myc-Epitop versehenen HNF4 Δ EF transfizierten 293-Zellen in Gelretardationsansätze eingesetzt und in seiner Hemmbarkeit mit Mt-HNF4 α verglichen (Abb. 19b). Um unterschiedliche Proteinkonzentrationen in den einzelnen Gelretardationsansätzen zu vermeiden, die sich auf die Bindungsstärke auswirken könnten, wurde in dieser Gelretardationsanalyse eine proteinfreie Präparation des proteaseresistenten Teils des Inhibitors verwendet (vgl. 2.2). Außerdem wurde in allen Ansätzen ein Antikörper gegen den myc-tag eingesetzt, da Mt-HNF4 Δ EF in Gelretardationsversuchen nur mit zugegebenem Antikörper nachzuweisen ist. Dieser stabilisiert offensichtlich die DNA-Bindung des Konstruktes, dem die Dimerisierungsdomäne fehlt (vgl. Lausen et al., 2000).

Die Bindung von Mt-HNF4 Δ EF an DNA wird, wie die von HNF4 α (Bahnen 3-6), von hohen Konzentrationen an Inhibitor vollständig, von niedrigeren noch partiell gehemmt (Bahnen 9-12). Da HNF4 Δ EF in gleichem Maße von Inhibitor gehemmt wird wie HNF4 α , sind die Domänen E und F von HNF4 α offensichtlich nicht nötig zur Vermittlung der Inhibitorwirkung. Daher kann der HNF4-Inhibitor nicht als klassischer Ligand von HNF4 α wirken.

4. Die A/B-Domäne von HNF4 α ist notwendig, aber nicht hinreichend für eine Hemmbarkeit der DNA-Bindung durch Inhibitor

Wie gezeigt, sind die E- und F-Domänen von HNF4 α zur Inhibierbarkeit der DNA-Bindung durch den HNF4-Inhibitor nicht nötig. Zur genaueren Charakterisierung der Inhibitorwirkung sollte die Domäne von HNF4 α , an der die Inhibitorwirkung angreift, weiter kartiert werden. Dazu wurde die Rolle der A/B-Domäne für die Hemmbarkeit von HNF4 α untersucht.

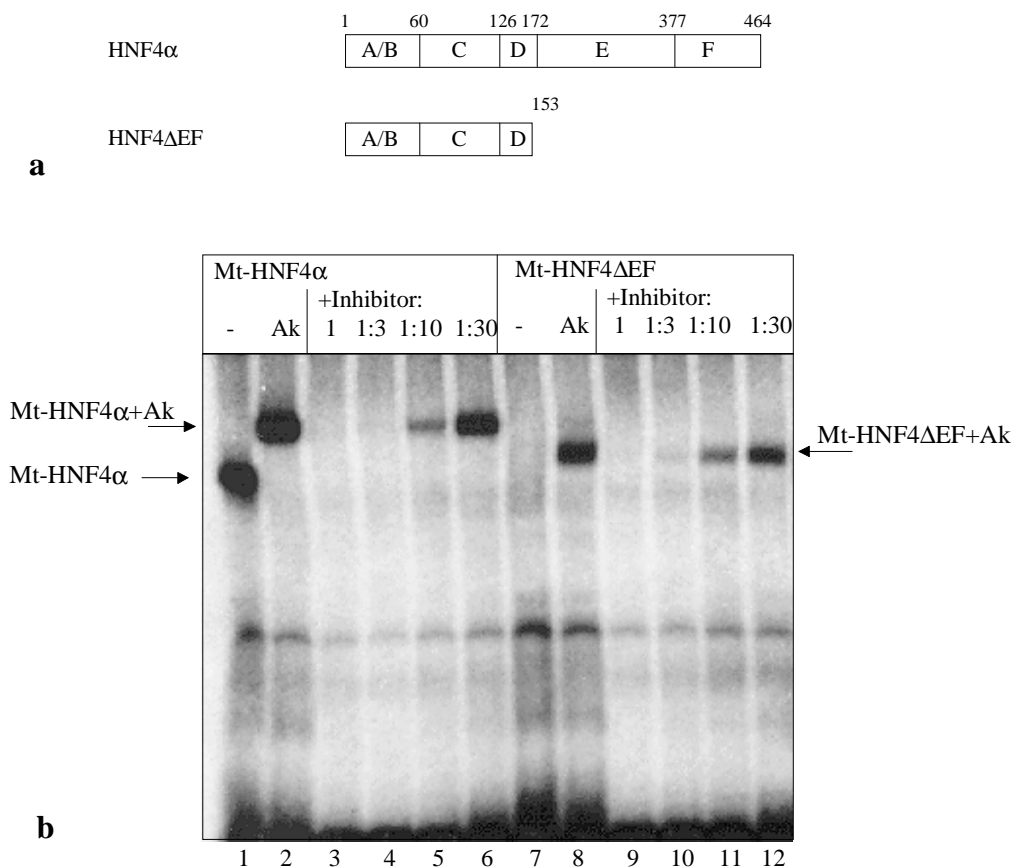


Abb. 19: Inhibitorische Wirkung des HNF4-Inhibitors auf ein HNF4 α -Konstrukt ohne Ligandenbindungsdomäne

a) Schematische Darstellung der Sequenzen von HNF4 α und dem Deletionskonstrukt HNF4 Δ EF (nicht maßstabsgetreu)

b) Kernextrakte aus mit myc-getaggttem humanen HNF4 α (Mt-HNF4 α) und Mt-HNF4 Δ EF transfizierten 293-Zellen (1 μ l/Bahn) wurden in Gelretardationsansätze mit markierter HNF4-Bindestelle eingesetzt (Bahn 1, 7). In den Bahnen 2-6 und 8-12 wurde der gegen den myc-tag gerichtete monoklonale Antikörper 9E10 in die Reaktionen eingeschlossen. In den Bahnen 3-6 und 9-12 wurde je 1 μ l einer proteinfreien Inhibitorpräparation in den angegebenen Verdünnungen zugegeben. Die Positionen des HNF4 α -DNA-Komplexes und der Protein-DNA-Komplexe mit Antikörper (Ak) sind angegeben.

4.1 Die A/B-Domäne von HNF4 α ist essentiell für die Inhibierbarkeit der HNF4 α -DNA-Bindung durch den HNF4-Inhibitor

Um zu überprüfen, ob die A/B-Domäne von HNF4 α zur Hemmbarkeit notwendig ist, wurde ein HNF4 α -Konstrukt mit fehlender A/B-Domäne, HNF4 Δ AB (Abb. 20a) untersucht, indem ein Kernextrakt aus mit diesem Konstrukt transfizierten 293-Zellen in Gelretardationsansätze eingesetzt wurde. Einen Vergleich der Hemmbarkeit von HNF4 α mit

der des Deletionskonstruktes HNF4 Δ AB zeigt Abb. 20b. Die Bindung des Volllängen-HNF4 α ist stark (Bahn 1, 2). Sie wird durch die höchste eingesetzte Konzentration an proteinfreier Inhibitorpräparation fast vollständig gehemmt (Bahn 3). Niedrigere Inhibitorkonzentrationen hemmen die Bindung entsprechend schwächer (Bahn 4, 5).

Eine gleiche Menge Kernextrakt aus mit HNF4 Δ AB transfizierten Zellen bindet das markierte Oligonukleotid mit HNF4-Bindestelle wesentlich schwächer (Bahn 6, 7) als das Volllängen-Protein. Trotzdem wird diese schwächere Bindung nicht von der höchsten ein-

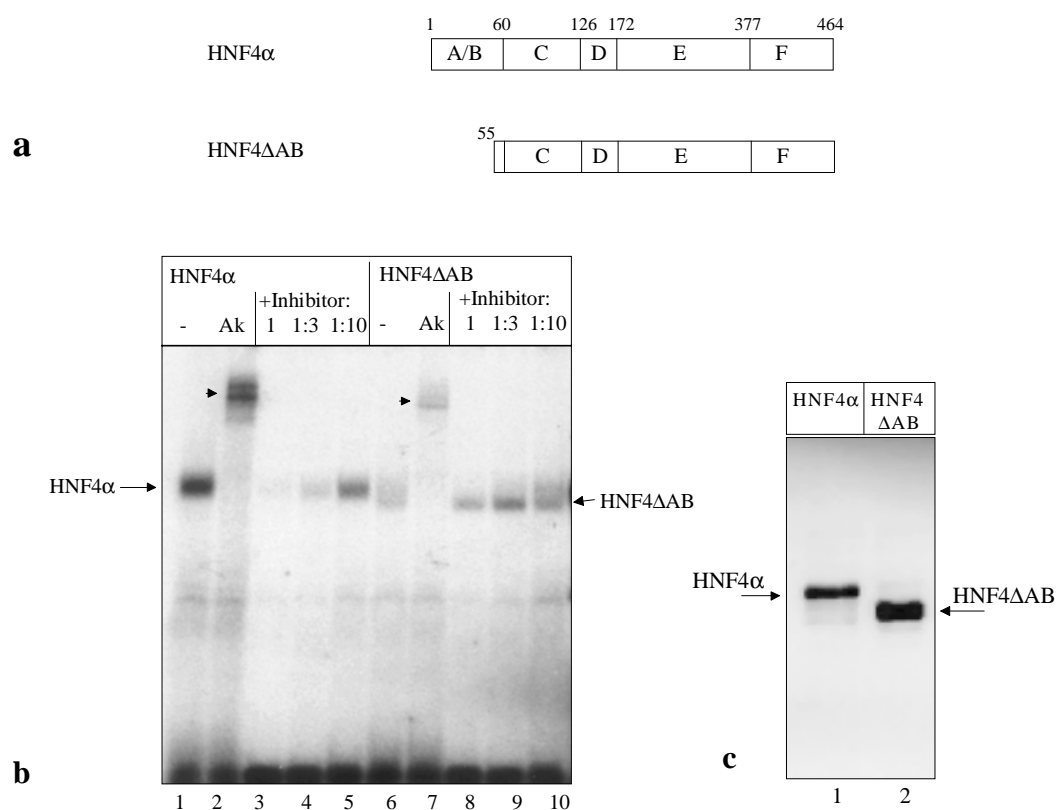


Abb. 20: Inhibitorische Wirkung des HNF4-Inhibitors auf Ratten-HNF4 α und das Deletionskonstrukt HNF4 Δ AB

a) Schematische Darstellung der Sequenz des HNF4 Δ AB-Konstruktes.

b) Kernextrakte aus mit Ratten-HNF4 α und HNF4 Δ AB transfizierten 293-Zellen (1 μ l/Bahn) wurden in Gelretardationsansätze mit markierter HNF4-Bindestelle eingesetzt (Bahn 1, 6). In den Bahnen 2 und 7 wurde der HNF4-spezifische Antikörper α III in die Reaktion eingeschlossen. In den Bahnen 3-5 und 8-10 wurde je 1 μ l einer proteinfreien Inhibitorpräparation in den angegebenen Verdünnungen zugegeben. Die Positionen des HNF4 α -DNA- und des HNF4 Δ AB-DNA-Komplexes sind angegeben, die durch den Antikörper weiter retardierten Komplexe durch Pfeilspitzen markiert.

c) Western Blot von je 3 μ l der Kernextrakte aus mit HNF4 α bzw. mit HNF4 Δ AB transfizierten Zellen. Die Proteine wurden mit dem HNF4-spezifischen Antikörper 39f detektiert, ihre Position ist angegeben.

gesetzten Inhibitorkonzentration gehemmt (Bahn 8). Es fällt jedoch auf, dass der HNF4 Δ AB-DNA-Komplex ohne Inhibitor eine sehr diffuse Bande bildet, die in Anwesenheit des Inhibitors schärfer zu sein scheint (vgl. Bahn 8 mit Bahn 6). Bei niedrigeren Inhibitorkonzentrationen scheint die Bindung sogar leicht verstärkt (Bahn 9), bei noch geringeren ist die Bande wieder weiter ausgedehnt (Bahn 10).

Eine Western Blot-Analyse (Abb. 20c) zeigt, dass in den Kernextrakten das HNF4 Δ AB-Protein (Bahn 2) in größerer Menge vorhanden ist als HNF4 α (Bahn 1). Die schwächere DNA-Bindung von HNF4 Δ AB gegenüber HNF4 α beruht daher nicht auf einer geringeren Proteinmenge, sondern auf einer geringeren DNA-Affinität des HNF4 Δ AB-Proteins. Somit beeinflusst die A/B-Domäne von HNF4 α sowohl seine DNA-Affinität als auch die Hemmbarkeit seiner DNA-Bindung in der Gelretardationsanalyse.

4.2 Die Spleißvarianten HNF4 α 1 und HNF4 α 7 werden gleichermaßen inhibiert

HNF4 α 7 ist eine Spleißvariante von HNF4 α , in der die A/B-Domäne verändert ist (Nakhei et al., 1998, schematisch dargestellt in Abb. 21a). Diese Spleißvariante entsteht durch die Verwendung eines anderen ersten Exons als bei HNF4 α 1. Im HNF4 α 7-Protein sind die ersten 38 Aminosäuren von HNF4 α 1 durch 15 Aminosäuren mit abweichender Sequenz ersetzt. Ab Aminosäure 39 (in HNF4 α 1) sind die Sequenzen identisch. Diese Spleißvariante eignet sich daher für eine genauere Lokalisierung der Inhibitor-Wirkstelle in HNF4 α , denn falls die Inhibitorwirkung innerhalb der ersten 38 Aminosäuren von HNF4 α angreifen sollte, würde HNF4 α 7 nicht inhibierbar sein.

Die Kernextrakte von mit HNF4 α 1- und HNF4 α 7-Konstrukten transfizierten 293-Zellen zeigen eine annähernd gleich starke DNA-Bindung (Abb. 21b, Bahnen 1-2 und 6-7). Durch Zugabe einer proteinfreien Inhibitorpräparation in hoher Konzentration wird die Bindung sowohl von HNF4 α 1 als auch von HNF4 α 7 fast vollständig gehemmt (Bahnen 3, 8). Auch bei geringeren Inhibitor-Konzentrationen ist kein Unterschied im Grad der Hemmbarkeit der beiden Konstrukte zu sehen (Bahnen 4, 5 und 9, 10).

Für die Vermittlung der Hemmbarkeit von HNF4 α durch den Inhibitor sind die ersten 38 Aminosäuren des HNF4 α -Proteins daher entweder nicht notwendig oder funktionell durch die ersten 15 Aminosäuren der HNF4 α 7-Spleißvariante zu ersetzen.

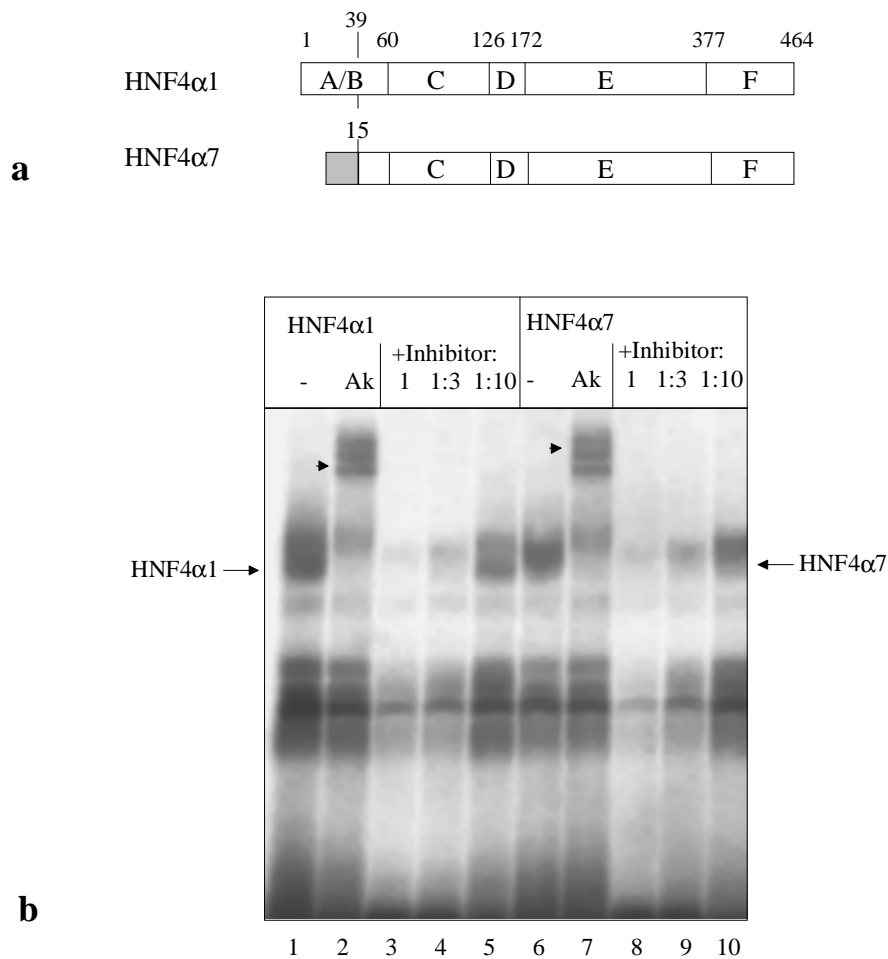


Abb. 21: Inhibitorische Wirkung des HNF4-Inhibitors auf HNF4 α 1 und HNF4 α 7

a) Schematische Darstellung der Sequenzen der beiden Spleißvarianten (nicht maßstabsgerecht). Die grau unterlegte Sequenz in HNF4 α 7 unterscheidet sich von der Sequenz von HNF4 α 1.

b) Kernextrakte aus mit HNF4 α 1 bzw. HNF4 α 7 transfizierten 293-Zellen (1 μ l/Bahn) wurden für eine Gelretardationsanalyse mit markierter HNF4-Bindestelle eingesetzt (Bahnen 1, 6). In den Bahnen 2 und 7 wurde der HNF4-spezifische Antikörper α III zu den Ansätzen gegeben. In den Bahnen 3-5 und 8-10 wurde je 1 μ l einer proteinfreien Inhibitorpräparation in den angegebenen Verdünnungen zugegeben. Die Positionen des HNF4 α 1-DNA- und des HNF4 α 7-DNA-Komplexes sind angegeben, die durch den Antikörper weiter im Gel retardierten Komplexe durch Pfeilspitzen markiert.

4.3 Die DNA-Bindung eines chimären Konstruktes aus HNF1 α und der A/B-Domäne von HNF4 α wird durch Inhibitor nicht gehemmt

Der HNF4-Inhibitor hemmt die DNA-Bindung eines HNF4 α -Konstruktes ohne A/B-Domäne nicht. Um zu überprüfen, ob die A/B-Domäne allein die Hemmbarkeit einer DNA-Bindung durch Inhibitor vermitteln kann, habe ich die A/B-Domänen des HNF4 α 1- bzw. des HNF4 α 7-Konstruktes zwischen den myc-tag und die HNF1 α -Sequenz eines Expressionsvektors für den mit HNF4 nicht verwandten Transkriptionsfaktor HNF1 α kloniert.

Die Hemmbarkeit des Ausgangskonstruktes Mt-hHNF1 α und der neuklonierten Konstrukte Mt(α 1)HNF1 α und Mt(α 7)HNF1 α wurde durch Gelretardation eines Oligonukleotids mit der HNF1-Bindestelle aus dem *Xenopus*-Albuminpromotor untersucht (Abb. 22). Die DNA-Bindung aller drei Konstrukte wird durch die eingesetzte proteinfreie Inhibitorpräparation nur geringfügig abgeschwächt, es gibt keinen Unterschied in der Inhibitorwirkung auf Mt-hHNF1 α (Bahnen 3-5) und Mt(α 1)HNF1 α oder Mt(α 7)HNF1 α (Bahnen 8-10 und Bahnen 13-15). Die Hemmbarkeit der Konstrukte wird daher durch die Übertragung der A/B-Domänen aus HNF4 α 1 bzw. HNF4 α 7 nicht verstärkt. Die beiden stärksten eingesetzten Inhibitorkonzentrationen (in den Bahnen 3, 4, 8, 9, 13 und 14) würden eine gleichstarke HNF4 α -DNA-Bindung vollständig hemmen (vgl. Abb. 20a), eine solche Hemmbarkeit wird durch Übertragung der A/B-Domäne auf HNF1 α nicht übertragen.

Mt-hHNF1 α und die chimären Konstrukte bilden auffälligerweise mit dem Oligonukleotid mit HNF1-Bindestelle einen unspezifischen Komplex, der konzentrationsabhängig von der eingesetzten proteinfreien Inhibitorpräparation gehemmt wird (Abb. 22, offene Pfeilspitze).

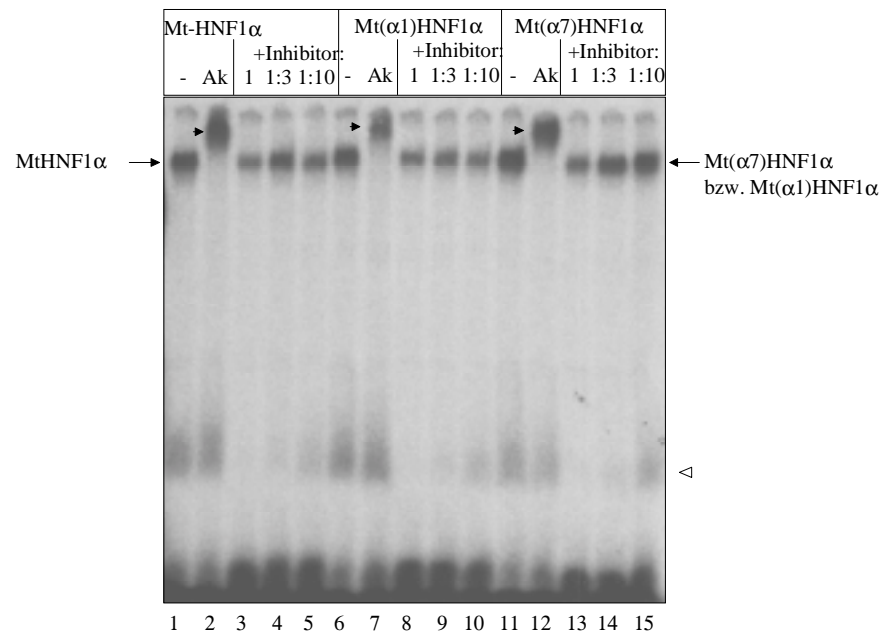


Abb. 22: DNA-Bindung chimärer Proteine aus Mt-HNF1 α und der A/B-Domäne von HNF4 α nach Inkubation mit HNF4-Inhibitor

Gelretardationsanalyse der chimären Konstrukte Mt(α 1)HNF1 α und Mt(α 7)HNF1 α , bei denen die A/B-Domäne von Maus-HNF4 α 1 bzw. -HNF4 α 7 zwischen den myc-tag und die humane HNF1 α -Sequenz von Mt-HNF1 α kloniert ist.

Kernextrakte aus mit den genannten Konstrukten transfizierten 293-Zellen (1 μ l/Bahn) wurden für eine Gelretardationsanalyse mit markierter HNF1-Bindestelle eingesetzt. In den Bahnen 2, 7 und 12 wurde der gegen den myc-tag gerichtete Antikörper 9E10 in die Reaktion eingeschlossen. In den Bahnen 3-5, 8-10 und 13-15 wurde je 1 μ l einer protein-freien Inhibitorpräparation in den angegebenen Verdünnungen zugegeben.

Die Positionen der Protein-DNA-Komplexe sind angegeben, die durch den Antikörper weiter im Gel retardierten Komplexe durch Pfeilspitzen gekennzeichnet.

Die offene Pfeilspitze markiert einen unspezifischen Komplex aus Kernextrakt-Proteinen und markierter DNA, dessen Ausbildung durch Inhibitor gehemmt wird.

5. Der HNF4-Inhibitor verändert die Gelmobilität von HNF4 α im nativen Proteingel

Um einen Einfluss des Inhibitors auf HNF4 α -Konstrukte unabhängig von deren DNA-Bindung nachzuweisen, wurde untersucht, ob der Inhibitor die Gelmobilität der Proteine ändert. Dazu wurden HNF4 α -Konstrukte mit Inhibitor inkubiert, in nativen Proteingelen aufgetrennt und die Proteine durch Blotten und Antikörpernachweis detektiert.

5.1 Der HNF4-Inhibitor ändert die Gelmobilität von HNF4 α in einem nativen Polyacrylamidgel, aber nicht in einem denaturierenden Proteingel

Für native Gelelektrophoresen wurden Kernextrakte aus 293-Zellen verwendet, die mit myc-getaggttem HNF4 α (Mt-HNF4 α) bzw. HNF1 α (Mt-HNF1 α , als Kontrollprotein) transfiziert worden waren. Die Gele wurden geblottet und die Proteine mit Antikörpern gegen den myc-tag nachgewiesen.

Die Gelmobilität von Mt-HNF4 α wird in einem nativen Proteingel nach Inkubation mit dem HNF4-Inhibitor aus einer MonoQ-Aufreinigung deutlich verringert (Abb. 23a, Bahn 1 und 2). Dieser Effekt ist spezifisch, da das Laufverhalten von Mt-HNF1 α (Bahn 3 und 4) nicht verändert wird. Mt-HNF1 α zeigt auf dem Blot zwei Banden, existiert also in zwei Formen unterschiedlicher Größe und/oder Ladung. Dabei handelt es sich wahrscheinlich um in posttranslationaler Modifikation oder im Grad der Oligomerisierung verschiedene Formen. Beide Banden sind unbeeinflusst von einer Inkubation mit Inhibitor.

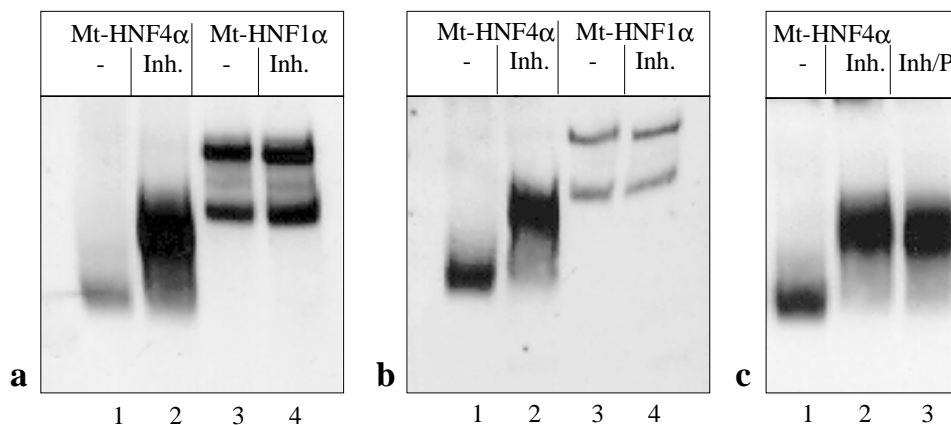


Abb. 23: Laufverhalten von Mt-HNF4 α im nativen Proteingel nach Inkubation mit HNF4-Inhibitor

a) Je 3 μ l Kernextrakt aus mit myc-getaggttem HNF4 α (Mt-HNF4 α) bzw. HNF1 α (Mt-HNF1 α) transfizierten 293-Zellen wurden mit 1 μ l H₂O (-) oder mit 1 μ l einer MonoQ-Inhibitorpräparation (Inh.) inkubiert. Die Ansätze wurden in einem nativen Proteingel aufgetrennt, geblottet und die Proteine durch einen Antikörper gegen den myc-tag detektiert.

b) Blot wie in a), jedoch wurden die Proteine im Gel vor dem Blotten denaturiert.

c) Blot wie in a) nach Inkubation von Mt-HNF4 α ohne (-), mit unbehandeltem HNF4-Inhibitor aus einer MonoQ-Aufreinigung (Inh.) und mit einer proteinfreien Inhibitorpräparation (Inh/P).

Die Mt-HNF4 α -Bande ist nach Inkubation mit HNF4-Inhibitor (Bahn 2) deutlich stärker als ohne Inhibitor (Bahn 1). Denaturiert man die Proteine nach der Elektrophorese im Gel und blottet erst danach, sind die Banden fast gleichstark (Abb. 23b, Bahn 1 und 2). Das weist darauf hin, dass der Inhibitor die Zugänglichkeit des Antikörpers gegen den myc-tag an das nicht denaturierte Mt-HNF4 α -Protein verändert.

Um auszuschließen, dass andere Bestandteile der MonoQ-Inhibitorpräparation die Gelmobilität von HNF4 α beeinflussen, wurde auch eine proteinfreie Präparation mit dem proteaseresistentem Teil des Inhibitors (vgl. 2.2) im nativen Gel eingesetzt (Abb. 23c). Der proteaseresistente Teil verringert die Gelmobilität von Mt-HNF4 α etwa in gleichem Maße wie unbehandelter Inhibitor (vgl. Bahn 3 mit Bahn 2).

Die Verringerung der Gelmobilität von HNF4 α im nativen Gel könnte auf eine kovalente Modifikation von HNF4 α durch Inhibitor zurückzuführen sein. Dann würde der deutliche Unterschied im Laufverhalten von HNF4 α nach Inkubation mit Inhibitor auf eine stärkere Modifikation (z. B. eine mehrfache Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung oder eine Glykosylierung) hinweisen. Eine solche starke Modifikation müsste im SDS-Proteingel als Größenveränderung des Proteins detektierbar sein. Mt-HNF4 α aus Kernextrakten transfizierter Zellen zeigt jedoch vor und nach Inkubation mit HNF4-Inhibitor keine Größenveränderung, die im SDS-Proteingel nachzuweisen wäre (Abb. 24).

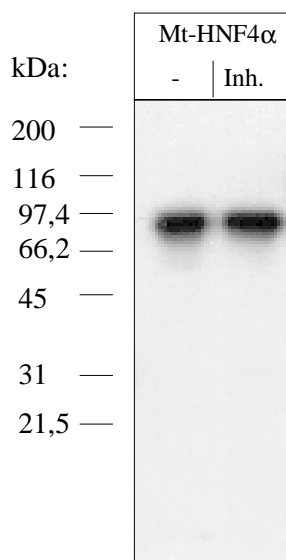


Abb. 24: Analyse von HNF4 α im SDS-Proteingel nach Inkubation mit HNF4-Inhibitor

Je 3 μ l Mt-HNF4 α aus Kernextrakten transfizierter Zellen wurde mit 1 μ l H₂O (-) und mit 1 μ l einer MonoQ-Inhibitorpräparation (Inh.) inkubiert. Die Ansätze wurden in einem SDS-Proteingel aufgetrennt, das Gel geblottet und das Mt-HNF4 α durch einen Antikörper gegen den myc-tag detektiert. Die Molekulargewichte von Markerproteinen in kDa sind angegeben.

5.2 Durch native Gelelektrophorese kann der Wirkort des Inhibitors in HNF4 α auf die Aminosäuren 55-153 kartiert werden

Der Befund, dass die DNA-Bindung der chimären HNF4 α (A/B)-HNF1 α -Konstrukte Mt(α 1)HNF1 α und Mt(α 7)HNF1 α nicht inhibiert wird (Abb. 22), wirft die Frage auf, ob der Inhibitor tatsächlich an der A/B-Domäne von HNF4 α wirkt oder ob er diese nur zur Vermittlung der Hemmung auf die DNA-Bindung von HNF4 α braucht. Zur Klärung dieser Frage und damit zur Kartierung des Wirkortes des Inhibitors auf HNF4 α habe ich HNF4 α -Konstrukte in nativer Gelelektrophorese auf eine Änderung ihrer Gelmobilität durch den Inhibitor untersucht.

Abb. 25a zeigt, dass die Gelmobilität der chimären HNF4 α (A/B)-HNF1 α -Konstrukte durch Inkubation mit HNF4-Inhibitor im nativen Proteingel nicht verändert wird. Die A/B-Domäne reicht somit nicht für die mit Vollängen-HNF4 α beobachtete Gelmobilitätsänderung durch Inhibitor im nativen Proteingel aus.

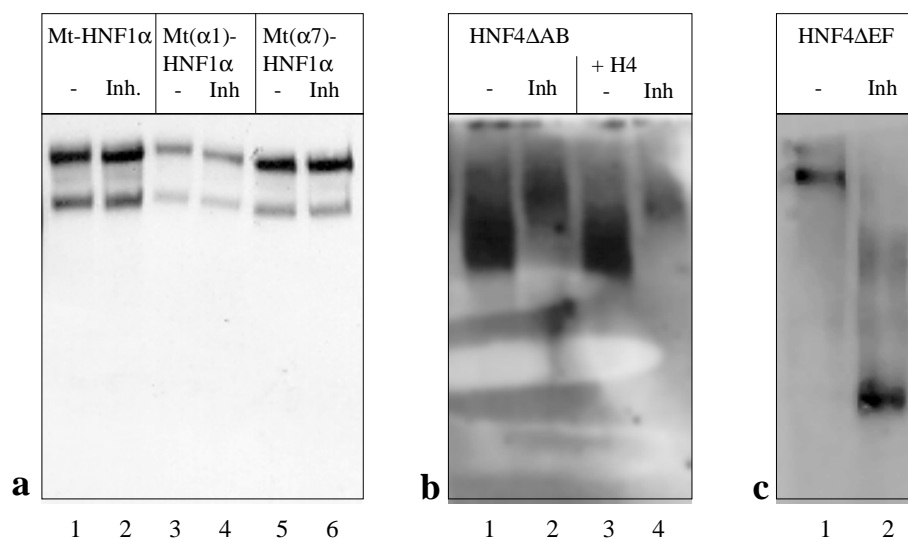


Abb. 25: Laufverhalten verschiedener HNF4 α -Konstrukte im nativen Proteingel nach Inkubation mit HNF4-Inhibitor

Je 3 μ l Kernextrakt aus mit den angegebenen Konstrukten transfizierten 293-Zellen wurden ohne (-) oder mit 1 μ l MonoQ-Inhibitorpräparation (Inh) in GRBB inkubiert, in einem nativem Proteingel aufgetrennt und geblottet.

a) Blot von myc-getagtem HNF1 α und den in 4.3 beschriebenen Konstrukten Mt(α 1)HNF1 α und Mt(α 7)HNF1 α , die Proteine sind mit einem Antikörper gegen den myc-tag nachgewiesen.

b) Blot von HNF4 Δ AB nach Inkubation ohne (Bahn 1, 2) und mit kaltem Oligonukleotid mit HNF4-Bindestelle (H4, Bahn 3, 4), nachgewiesen mit dem HNF4-spezifischen monoklonalen Antikörper 39f.

c) Blot des Deletionskonstruktes HNF4 Δ EF, nachgewiesen mit einem Antikörper gegen den myc-tag.

Die Gelmobilität von HNF4 Δ AB im nativen Proteingel wird durch Inhibitor verringert (Abb. 25b, Bahn 1, 2). Dieser Befund ist auffällig, da im Gelretardationsassay der Komplex aus HNF4 Δ AB und DNA durch Inhibitor weder verlangsamt noch gehemmt wird (vgl. Abb. 20). Um zu überprüfen, ob die im Gelretardationsassay eingesetzte DNA die Gelmobilitätsänderung von HNF4 Δ AB durch Inhibitor verhindert, wurde das HNF4 Δ AB-Protein nach Inkubation mit Inhibitor und einem Oligonukleotid mit HNF4-Bindestelle im nativen Gel detektiert. Auch in Anwesenheit der DNA wird die Gelmobilität von HNF4 Δ AB durch Inhibitor verringert (Abb. 25b, Bahnen 3, 4). Der Inhibitor wirkt daher auch auf dieses Konstrukt ohne A/B-Domäne.

Das HNF4 α -Deletionskonstrukt HNF4 Δ EF zeigt im nativen Proteingel eine geringe Mobilität (Abb. 25c, Bahn 1). Seine Gelmobilität wird durch Inkubation mit Inhibitor erhöht (Bahn 2). Dieser Befund bestätigt, dass der Inhibitor auf das verkürzte HNF4 α -Protein wirkt, wie es die Hemmung der HNF4 Δ EF-DNA-Bindung in der Gelretardationsanalyse (Abb. 17) schon gezeigt hatte. Da der Inhibitor die Gelmobilität von HNF4 Δ AB und von HNF4 Δ EF in nativen Gelen verändert, setzt seine Wirkung innerhalb der Aminosäuren 55 bis 153 von HNF4 α an.

IV. Diskussion

1. Der HNF4-Inhibitor ist protease- und nukleaseresistent, hydrophil und wird durch eine 5 kDa-Membran zurückgehalten

Eier und frühe Embryonalstadien von *Xenopus* enthalten eine Substanz, die die DNA-Bindung von HNF4 α inhibiert und an der Regulation von HNF4 α in der *Xenopus*-Embryogenese beteiligt sein könnte. Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung dieses HNF4-Inhibitors. Die erste Frage war dabei, zu welcher Substanzklasse der Inhibitor gehört. Insbesondere sollte geklärt werden, ob er ein Protein ist oder ein kleines lipophiles Molekül sein könnte, wie es bekannte Liganden von Kernrezeptoren sind.

HNF4-Inhibitor konnte aus *Xenopus*-Eiern oder -Ovar durch selektives Ausfällen hitze-labiler Proteine und MonoQ-Anionenaustauschchromatographie aufgereinigt werden. Dadurch wurde der Inhibitor, geschätzt nach Proteingelen und Gelretardationsversuchen, zu über 100fach aufgereinigt. Eine genauere Angabe des Aufreinigungsgrades ist nicht möglich, weil zum einen der hohe Lipidgehalt des Ei-Rohextraktes eine genaue Proteinbestimmung verhindert, zum anderen die spezifische Aktivität des Inhibitors im Gelretardationsversuch nicht gemessen werden kann, da anzunehmen ist, dass die Präparationen auch unspezifisch die Protein-DNA-Interaktionen hemmende Aktivitäten enthalten.

Nach der MonoQ-Aufreinigung korrelierte die inhibitorische Aktivität in den Fraktionen mit der Menge eines Proteins von ca. 25 kDa (Abb. 2). Der HNF4-Inhibitor ist nicht mit diesem Protein identisch, da er sich unter den denaturierenden Bedingungen einer SDS-Gelelektrophorese vom 25 kDa-Protein trennt (Abb. 3). Unter den nichtdenaturierenden Bedingungen verschiedener Chromatographieverfahren war er dagegen nicht vom 25 kDa-Protein abzutrennen (Abb. 2 und Holewa, unveröffentlichte Daten), was darauf hinweisen könnte, dass er spezifisch an dieses Protein bindet.

Der HNF4-Inhibitor läuft im SDS-Proteingel in einem Bereich, der Protein-Molekulargewichten von 10-13 kDa entsprechen würde (Abb. 3), in dem aber weder mit Coomassie-

noch mit Silberfärbung Proteinbanden detektiert werden konnten (Abb. 2c und nicht gezeigte Daten). Außerdem ist das Laufverhalten untypisch für ein Protein, da die inhibitorische Aktivität sich nicht in einer scharfen Bande auftrennt, sondern über einen weiteren Bereich verteilt ist (Abb. 3b, 8). Um zu untersuchen, ob der HNF4-Inhibitor ein Protein ist, wurden daher MonoQ-Inhibitorpräparationen mit verschiedenen Proteasen behandelt. Die inhibitorische Funktion ist proteaseresistent, der Inhibitor bleibt selbst nach einem Verdau mit einer Mischung von Proteasen unterschiedlicher Spezifität, die Proteine bis in einzelne Aminosäuren hydrolysiert, aktiv (Abb. 4). Die Hemmwirkung des HNF4-Inhibitors auf die DNA-Bindung von HNF4 α wird somit nicht durch einen Proteinanteil ausgeübt. Die Inhibitorwirkung ist nach Verdau mit verschiedenen Proteasen sogar verstärkt (Abb. 4 und nicht gezeigte Daten), was bedeuten könnte, dass ein Peptidteil im Inhibitor seine Aktivität herabsetzt.

Tatsächlich enthält der HNF4-Inhibitor einen Peptidanteil, da die Hemmaktivität nach Proteaseverdau im denaturierenden Proteingel eine erhöhte Gelmobilität zeigt, das Molekül also kleiner wird (Abb. 5).

Da die Größe eines Nichtproteins im denaturierenden Proteingel nicht zu bestimmen ist, wurde Ultrafiltration durch eine Membran mit der Ausschlussgröße 5 kDa durchgeführt, um das Molekulargewicht des HNF4-Inhibitors abzuschätzen. Der Inhibitor wird dabei im Konzentrat zurückgehalten, ist also größer als der Porendurchmesser einer 5 kDa-Membran (Abb. 6a). Das proteaseresistente Inhibitorfragment nach Trypsin-Verdau wird ebenfalls durch die 5 kDa-Membran zurückgehalten (Daten nicht gezeigt). Das Fragment nach Pronase-Verdau ist dagegen kleiner als das trypsinresistente Fragment, da es die Membran partiell durchdringen kann (Abb. 6b). Beim Trypsin-Verdau bleibt offensichtlich zumindest eine Peptidbindung erhalten, die durch die Pronase gespalten wird. Das Inhibitormolekül enthält somit mindestens zwei enzymatisch spaltbare Peptidbindungen.

Da der Inhibitor aus einem Peptidanteil und einem kovalent gebundenen proteaseresistenten Teil zu bestehen scheint, könnte er ein Glykoprotein sein. Proteine können durch N-glykosidische Bindung von Zuckerresten an einen Asparaginrest des Peptids oder durch O-glykosidische Bindungen an Serin- oder Threoninreste glykosyliert sein. Ob der HNF4-Inhibitor eine N-glykosidische Bindung enthält, konnte durch Inkubation mit N-Glykosidase F geprüft werden, die diese Bindungen spezifisch spaltet. Falls die inhibitorische Aktivität von einer N-glykosidisch gebundenen Zuckereinheit ausgeübt werden sollte, müsste nach der Inkubation der Zuckerrest ohne Peptidanteil kleiner werden, so wie nach der Entfernung des Peptidanteils durch Pronase-Verdau. Bei der Lokalisation im

Proteingel findet sich aber die stärkste Hemmaktivität vor wie nach der Glykosidase-Behandlung in der gleichen Fraktion (Abb. 7). Der HNF4-Inhibitor ist daher kein Protein mit N-glykosidisch gebundenem Zucker.

Eine intrazellulär weitverbreitete Form der O-gebundenen Glykosylierung ist die O-glykosidische Bindung einzelner N-Acetylglucosamin-Monosaccharide (Hart, 1997, Snow und Hart, 1998). Dass die inhibitorische Funktion von einem einzelnen Zuckerrest ausgeübt wird, kann jedoch ausgeschlossen werden, da das inhibitorisch wirksame Fragment nach Pronaseverdau durch die 5 kDa-Membran partiell zurückgehalten wird, während ein einzelner Zuckerrest viel kleiner ist (N-Acetylglucosamin: 221 Da). Eine andere Form der O-glykosidischen Bindung, bei dem ein Zuckereinheit von ca. 25 Resten (= ca. 5 kDa) die inhibitorische Funktion ausüben würde, kann dagegen nicht ausgeschlossen werden.

Eine weitere naheliegende Möglichkeit, wie die inhibitorischen Funktion ausgeübt werden könnte, wäre ein Nukleotidanteil im Inhibitor, der an die DNA-Bindedomäne von HNF4 α bindet und so die markierten Oligonukleotide im Gelretardationsansatz aus der Bindung verdrängt. Diese Möglichkeit trifft nicht zu, da die inhibitorische Funktion resistent gegenüber der Behandlung mit Nukleasen ist (Abb. 9).

Ein Mechanismus, der auf dem Abfangen der für die HNF4 α -DNA-Bindung wichtigen Zinkionen beruht, kann ebenfalls ausgeschlossen werden, da der inhibitorische Effekt nicht durch Zugabe von Zinkionen aufgehoben wird (Abb. 10).

Nach seinem Löslichkeitsverhalten ist der Inhibitor hydrophil, er löst sich nicht in Phenol/Chloroform (Abb. 12) und einigen anderen organischen Lösungsmitteln (Butanol, Diethylether; Daten nicht gezeigt). Die Hydrophilie beruht offensichtlich auf negativen Ladungen des Inhibitors. Dafür spricht die Tatsache, dass er sich in einer Anionenaustauschersäule auftrennen lässt (Abb. 2), während er durch eine Kationenaustauschersäule durchläuft (Holewa, unveröffentlicht). Außerdem läuft der Inhibitor in einem nativen Proteingel in Richtung auf die Anode, wie eine Gelelution aus einem nativen Gel ergab (Daten nicht gezeigt), d. h. er ist bei pH 8,8 negativ geladen.

Der HNF4-Inhibitor kann zusammenfassend charakterisiert werden als ein hydrophiles, bei pH 8,8 negativ geladenes Molekül, das einen Peptidanteil und einen protease- und nukleaseresistenten, inhibitorisch wirksamen Teil enthält und größer ist als der Porendurchmesser einer 5 kDa-Membran.

2. Peptid- und proteaseresistenter Anteil des Inhibitors bieten Ansatzmöglichkeiten für eine biochemische Analyse

Der HNF4-Inhibitor konnte nach Elution aus einem denaturierenden Proteingel mittels reversed phase-HPLC aufgereinigt werden, dabei befand er sich in einer offensichtlich homogenen Fraktion (Abb. 11). Diese Aufreinigung war allerdings nur in einem analytischen Maßstab möglich. In einem präparativen größeren Ansatz wurde, wahrscheinlich durch eine zu hohe SDS-Konzentration aus der Gelelution, keine Auftrennung erreicht. Damit war es nicht möglich, auf diesem Wege genügend Material für Strukturanalysen aufzureinigen.

Da der Inhibitor als ganzes Molekül nicht in größeren Mengen aufzureinigen ist, wäre ein nächster Ansatz, seinen proteaseresistenten Teil getrennt zu untersuchen. Dazu ist eine völlig proteinfreie Präparation nach Pronaseverdau geeignet (Abb. 12). Das pronase-resistente Inhibitorfragment lässt sich nach dem Verdau mit Phenol/Chloroform extrahieren und durch MonoQ-Säulenchromatographie auftrennen, was ein Entfernen evt. noch verbliebener Peptide ermöglicht. Außerdem lässt es sich mit Ethanol fällen und kann so gewaschen und aufkonzentriert werden. Die erhaltene Präparation lässt sich voraussichtlich besser als geleluierter Inhibitor durch HPLC aufreinigen. So könnte es möglich sein, eine genügend große Menge an pronaseresistentem Inhibitorfragment für weitere Analysen, z. B. Gaschromatographie mit anschließender Massenspektrometrie, aufzuarbeiten. Auf diese Weise könnte die chemische Natur des inhibitorisch wirksamen Teils des HNF4-Inhibitors aufgeklärt werden.

Der Inhibitor enthält mindestens zwei Peptidbindungen, könnte aber auch eine längere Peptidsequenz enthalten. In diesem Fall böte sich als zweiter Ansatz zur Analyse eine Sequenzierung des Peptidteils an. Die geleluierte, HPLC-aufgereinigte Inhibitorfraktion (Abb. 11) wurde in Zusammenarbeit mit Dr. H. Prinz (Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie, Dortmund) durch „Electrospray“-Tandem-Massenspektroskopie (Mann und Wilm, 1995) untersucht, die zur Peptidsequenzierung eingesetzt wird. Dabei wurde kein Signal erhalten, und es konnte nicht geklärt werden, ob zu wenig Material eingesetzt worden war oder ob der proteaseresistente Teil des Inhibitors auf unbekannte Weise mit der Detektion im Massenspektrometer interferiert. Falls dies der Fall sein sollte, könnte man eine Ansequenzierung nach HPLC-Aufreinigung des (der) Peptids(e), die durch Trypsinverdau vom Inhibitor abgespalten werden, durchführen. Die Sequenzierung würde

zwar keinen Aufschluss über die chemische Natur der inhibitorischen Komponente geben, würde aber weitere Analysemöglichkeiten eröffnen, da über synthetische Peptide Antikörper gegen den Peptidteil des Inhibitors gerichtet werden könnten, die seine Lokalisierung in Zellen, Geweben und Spezies und die Aufreinigung des Inhibitors durch Affinitätschromatographie zur weiteren Analyse ermöglichen würden.

3. Der HNF4-Inhibitor ist kein klassischer Ligand von HNF4 α

Eine erste wichtige Frage zur Funktionsweise des HNF4-Inhibitors war, ob er als klassischer Ligand auf HNF4 α wirkt. Wie in der Einleitung dargestellt, wurde HNF4 α als Orphan-Rezeptor gefunden. Die starke Übereinstimmung der Ligandenbindungsdomäne auf Aminosäureebene mit der Sequenz des liganden-regulierten RXR weist auf eine wichtige Funktion dieser Domäne hin und verleitet zu der Spekulation, dass auch HNF4 α durch einen Liganden reguliert sein könnte (Sladek, 1994).

Wie das Beispiel des Androstanol-Rezeptors CAR zeigt, können endogene Liganden auch inhibitorisch auf einen Kernrezeptor wirken, der ohne Ligand konstitutiv aktiv ist (Forman et al., 1998, vgl. Einleitung). Eine naheliegende und attraktive Hypothese war daher, dass der HNF4-Inhibitor als klassischer Ligand an die Ligandenbindungsdomäne von HNF4 α bindet und dessen Konformation so verändert, dass seine DNA-Affinität vermindert wird. Die Acyl-CoenzymA(CoA)-Thioester, die im Verlauf dieser Arbeit als Liganden von HNF4 α publiziert wurden (Hertz et al., 1998, vgl. Einleitung), boten einen ersten Ansatz, eine mögliche ligandenähnliche Wirkweise des Inhibitors zu untersuchen. Sie binden spezifisch an die Ligandenbindungsdomäne von HNF4 α und sollen dessen DNA-Affinität beeinflussen, dabei sollen Verbindungen mit kurzkettigen Fettsäuren (C14, C16) die HNF4 α -Bindung an ein DNA-Erkennungselement verstärken, solche mit langkettigen Fettsäuren (C18, C20) sie dagegen hemmen (Hertz et al., 1998).

Der Inhibitor scheint zwar größer zu sein als Acyl-CoA-Verbindungen, könnte jedoch in seiner Wirkweise gleich ansetzen. Dann sollten Inhibitor und aktivierende Acyl-CoA-Verbindungen sich gegenseitig in ihrer Wirkung aufheben. Im Gelretardationsversuch (Abb. 14) konnte allerdings keine Verstärkung der DNA-Bindung von HNF4 α durch

Acyl-CoA-Verbindungen erreicht werden. Daher konnte auch nicht getestet werden, ob eine verstärkende Acyl-CoA-Verbindung die Hemmwirkung des Inhibitors aufhebt.

Die Spezifität der Inhibitorwirkung zeigt, dass er mit keiner der untersuchten Acyl-CoA-Verbindungen identisch ist. Stearoyl-CoA (C18:0-CoA) und Palmitoyl-CoA (C16:0-CoA) hemmen in einer Endkonzentration von 10 μ M die DNA-Bindung von HNF4 α und dem HNF4 α nicht verwandten POU/Homöobox-Transkriptionsfaktor HNF1 α gleichermaßen und zeigen in einer Konzentration von 5 μ M keinen Einfluss auf die DNA-Bindung beider Faktoren. Der Inhibitor dagegen hemmt über einen weiten Konzentrationsbereich spezifisch die DNA-Bindung von HNF4 α und beeinflusst die HNF1 α -DNA-Bindung nicht (Abb. 14). Da sich Acyl-CoA-Thioester und Inhibitor somit grundlegend in ihren Hemmeigenschaften auf die DNA-Bindung im Gelretardationsversuch unterscheiden, scheint der Inhibitor nicht zur Klasse der Acyl-CoA-Verbindungen zu gehören.

Meine Ergebnisse stehen in Widerspruch zu den von Hertz et al. (1998) veröffentlichten Daten, da ich keine Verstärkung der DNA-Bindung durch kurzkettige Acyl-CoA-Verbindungen beobachten konnte. Auch unter den experimentellen Bedingungen von Hertz et al., im wesentlichen ein anderer Bindepuffer und andere Elektrophoresebedingungen, waren deren Ergebnisse nicht zu reproduzieren. Hier zeigten 10 μ M Stearoyl- bzw. Palmitoyl-CoA keine Auswirkung auf die DNA-Bindung von HNF4 α aus Leberkernextrakt und nur eine leichte Abschwächung der DNA-Bindung von His-getagtem HNF4 α (Abb. 15).

Eine Erklärung für diese Differenz könnte in den unterschiedlichen für die Gelretardation verwendeten Oligonukleotiden liegen. Hertz et al. verwendeten die Bindestelle aus dem ApoCIII-Promotor, ich die aus dem *Xenopus*-HNF1 α -Promotor. Es ist allerdings unwahrscheinlich, dass die Verwendung einer anderen DNA-Bindestelle einen solchen Unterschied ausmacht.

Außerdem spricht ein neuerer Befund dagegen, dass HNF4 α durch einen Liganden aktiviert wird. Die ligandenabhängige Aktivierungsfunktion von Kernrezeptoren wird durch Bindung von Koaktivatoren vermittelt (Übersichtsartikel: Torchia et al., 1998). HNF4 α interagiert *in vitro* ohne Zugabe von Liganden mit dem Koaktivator GRIP1 (Sladek et al., 1999). Da HNF4 α ligandenunabhängig Koaktivatoren binden kann, scheint es konstitutiv aktiv zu sein. Ein möglicher Ligand könnte damit nur hemmend auf HNF4 α wirken, ähnlich wie beim oben genannten konstitutiv aktiven Rezeptor CAR.

Unter den Reaktionsbedingungen von Hertz et al. (1998) wirkt der HNF4-Inhibitor nicht hemmend auf die HNF4 α -DNA-Bindung. Diese Inaktivierung des Inhibitors ist auf Magnesiumionen zurückzuführen, die in den Gelretardationsansätzen die Hemmwirkung des Inhibitors ab einer Konzentration von ca. 100 μM Mg^{2+} aufheben (Abb. 16). Die intrazelluläre Magnesium-Konzentration könnte daher die Aktivität des HNF4-Inhibitors beeinflussen. Auf welche Weise der Inhibitor von Magnesiumionen gehemmt wird, ist wohl erst nach der Bestimmung seiner Struktur zu klären. Die Mg^{2+} -Inaktivierung des Inhibitors wird jedoch durch EDTA aufgehoben, der Inhibitor wird also nicht durch Mg^{2+} -abhängige Enzyme irreversibel verändert (Daten nicht gezeigt).

Für viele Kernrezeptoren ist bekannt, dass die Ligandenbindung eine Konformationsänderung im Protein auslöst, die es resistenter gegenüber Proteaseverdau macht (z. B. Allan et al., 1992, Leng et al., 1993, Lazennec et al., 1997, Lin et al., 1997, Xu et al., 1996). Dieses Verhalten kann für einen Ligandenbindungstest ausgenutzt werden (Zeng et al., 1994). Für den Progesteronrezeptor wurde gezeigt, dass nicht nur Progesteron, sondern auch das Antiprogestin RU486 eine durch partielle Proteolyse nachweisbare Konformationsänderung induziert (Allan et al., 1992). Damit sollte auch der Inhibitor ähnliche Konformationsänderungen in HNF4 α induzieren, falls er als Ligand an HNF4 α bindet.

In vitro synthetisiertes, ^{35}S -markiertes Protein zeigt nach Inkubation mit Inhibitor keine erhöhte Proteaseresistenz (Abb. 18). Der Inhibitor induziert keine Konformationsänderung in HNF4 α , die in der Veränderung des Musters proteaseresistenter Fragmente resultieren würde.

Dieses Ergebnis ist jedoch wahrscheinlich von geringer Aussagekraft, da verschiedene Befunde dafür sprechen, dass das *in vitro* synthetisierte, ^{35}S -markierte *Xenopus*-HNF4 α (Abb. 17) wie auch Ratten-HNF4 α (nicht gezeigt) anders ist als das in Zellen produzierte. Zum einen läuft die Hauptbande von ^{35}S -markiertem HNF4 α nicht auf gleicher Höhe wie das ^{32}P -Signal des markierten Oligonukleotids, d. h. der Großteil des *in vitro* synthetisierten HNF4 α bindet keine DNA (Daten nicht gezeigt). Zum zweiten wird die DNA-Bindung erst durch eine hohe Inhibitorkonzentration gehemmt, die bereits eine unspezifische Wirkung auf die Protein-DNA-Interaktionen im Gelretardationsansatz hat, da die HNF1 α -DNA-Bindung ebenfalls beeinträchtigt wird (Abb. 17). Zum dritten wird die Gelmobilität von *in vitro* synthetisiertem HNF4 α im nativen Proteingel nicht reproduzierbar durch Inhibitor verändert (Daten nicht gezeigt), wie es bei HNF4 α aus transfizierten

Zellen der Fall ist (Abb. 23). Diese Befunde zeigen, dass das *in vitro* produzierte HNF4 α andere Eigenschaften besitzt als das in Zellen hergestellte und nicht oder nur zum Teil auf den HNF4-Inhibitor reagiert. Diese abweichenden Eigenschaften des *in vitro* synthetisierten HNF4 α könnten auf eine andere posttranslationale Modifikation (z. B. Phosphorylierung) des Proteins im *in vitro*-System zurückzuführen sein. Eine solche Möglichkeit anzunehmen ist plausibel, da HNF4 α schon bei der Expression in verschiedenen Zelltypen verschieden stark phosphoryliert wird (Jiang et al., 1997).

Die Wirkung von Liganden auf Kernrezeptoren erfolgt über die Ligandenbindungsdomäne (LBD), eine funktionell autonome Domäne, die auch isoliert und als chimäres Protein die Fähigkeit zur Ligandenbindung beibehält (Moras und Gronemeyer, 1998, Müller-Farnow und Egner, 1999). Dass der HNF4-Inhibitor die DNA-Bindung des Deletionskonstruktes HNF4 Δ EF hemmt (Abb. 19), dem die gesamte LBD fehlt, ist der Beweis, dass die Ligandenbindungsdomäne für die Hemmbarkeit von HNF4 α nicht nötig ist. Damit ist der Inhibitor kein klassischer Ligand von HNF4 α .

4. Der Inhibitor verändert spezifisch die Gelmobilität von HNF4 α in nativen Proteingelen

Der Inhibitor war bisher ausschließlich als eine die HNF4 α -DNA-Bindung hemmende Substanz nachzuweisen (Holewa, 1995). Meine Ergebnisse zeigen, dass der Inhibitor auch unabhängig von der DNA-Bindung auf das HNF4 α -Protein wirkt. Er verändert das HNF4 α -Protein, indem er zum einen die Gelmobilität von Mt-HNF4 α in einem nativen Proteingel verringert (Abb. 23a), zum anderen dessen Zugänglichkeit für einen Antikörper gegen den myc-tag erhöht (Abb. 23a, b).

Die Gelmobilitätsänderung zeigt zudem eine klare Spezifität der Inhibitorwirkung auf HNF4 α , da Gelmobilität oder Antikörper-Zugänglichkeit von Mt-HNF1 α nicht beeinflusst werden (Abb. 23a, b). Das ist ein entscheidender Befund, weil in Gelretardationsexperimenten Inhibitorpräparationen auch eine unspezifische Wirkung auf die Protein-DNA-Interaktionen haben können. Die Bindung von *in vitro* hergestelltem HNF1 α an DNA wird durch hohe Konzentrationen an Inhibitor beeinträchtigt (Abb. 17), auch die

DNA-Bindung von HNF1 α aus transfizierten Zellen wird abgeschwächt (Abb. 22). Außerdem bilden die Kernextrakte von mit Mt-HNF1 α oder HNF1 α -Chimären transfizierten Zellen einen Protein-DNA-Komplex, der kein HNF1 α enthält und dessen Ausbildung abhängig von der Inhibitorkonzentration gehemmt wird (Abb. 22, offene Pfeilspitze). Im Fall der HNF1 α -Kernextrakte wurde eine proteinfreie Inhibitorpräparation eingesetzt, um einen unspezifischen Einfluss von Proteinen in der Inhibitorpräparation auf Protein-DNA-Interaktionen auszuschließen. Die unspezifische Hemmwirkung dieser Inhibitorpräparation bedeutet, dass sie entweder noch Verunreinigungen enthält, die unspezifisch Protein-DNA-Bindungen hemmen, oder dass das proteaseresistente Inhibitorfragment selbst auch mit anderen Protein-DNA-Interaktionen interferiert.

In Gelretardationsexperimenten scheint der Inhibitor auch die DNA-Bindung von HNF4 β , des Retinsäurerezeptor-Heterodimers RAR/RXR und des Progesteronrezeptors zu vermindern (Holewa, unveröffentlichte Daten), wobei aber ein unspezifischer Effekt nicht ausgeschlossen werden kann. Mit der klaren Spezifität der Inhibitorwirkung auf die Gelmobilität von HNF4 α -Protein bietet sich nun die Möglichkeit, diese Ergebnisse zu überprüfen und zu bestimmen, ob der Inhibitor auch auf andere Mitglieder der Steroidhormonrezeptor-Superfamilie wirkt.

5. Die Inhibitorwirkung setzt innerhalb der Aminosäuren 55-153 von HNF4 α an

Um näheren Aufschluss über die Wirkweise des HNF4-Inhibitors zu gewinnen, sollte der Angriffsort seiner Wirkung im HNF4 α -Molekül genauer kartiert werden. Dazu wurden beide Wirkungen des Inhibitors auf HNF4 α ausgewertet, die Hemmung der DNA-Bindung von HNF4 α in Gelretardationsanalysen und die Änderung der Gelmobilität von HNF4 α in nativen Proteingelen. In beiden Assays wurden Vollängen-HNF4 α und verschiedenen HNF4 α -abgeleitete Konstrukte untersucht (zusammengefasst in Tab. 1).

Um im ersten Assay, der Gelretardationsanalyse, die Rolle der A/B-Domäne für die Hemmbarkeit der HNF4 α -DNA-Bindung zu untersuchen, wurde ein HNF4 α -Konstrukt, dem mit Aminosäure 1-54 die gesamte A/B-Domäne fehlt (HNF4 Δ AB), verwendet. Dieses Konstrukt hat eine viel geringere DNA-Affinität als Vollängen-HNF4 α (Abb. 20).

Eine Rolle der A/B-Domäne für die DNA-Bindung von HNF4 α wurde bisher nicht explizit beschrieben, doch ein HNF4 α -Konstrukt ohne A/B- und F-Domäne bindet ebenfalls schwächer an DNA als das Volllängenprotein (in Hadzopoulou-Cladaras et al., 1997).

Die A/B-Domäne scheint an der Hemmbarkeit von HNF4 α durch Inhibitor beteiligt zu sein, da die DNA-Bindung von HNF4 Δ AB nicht durch Inhibitor gehemmt wird (Tab. 1). Das gilt selbst für eine zehnfach höhere Inhibitor-Konzentration als die, die zur Hemmung der viel stärkeren DNA-Bindung des Volllängen-HNF4 α ausreicht (Abb. 20). Allerdings erscheint die diffuse HNF4 Δ AB/DNA-Bande nach Zugabe des Inhibitors als schärfere Bande (Abb. 20), der Inhibitor scheint daher auch HNF4 Δ AB zu beeinflussen.

Um die Rolle der A/B-Domäne genauer zu definieren, wurde die Spleißvariante HNF4 α 7 verwendet, bei der N-terminal die ersten 38 Aminosäuren von HNF4 α 1 durch eine abweichende Sequenz von 15 Aminosäuren ersetzt sind (Nakhei et al., 1998). Der Effekt des Inhibitors auf die DNA-Bindung dieser Spleißvariante ist gleich stark wie der Effekt auf HNF4 α 1.

Um zu überprüfen, ob die A/B-Domäne von HNF4 α zur Vermittlung der Inhibitorwirkung ausreicht, wurden die A/B-Domäne von HNF4 α 1 bzw. HNF4 α 7 vor die Sequenz von HNF1 α kloniert. Da der Inhibitor die DNA-Bindung der so konstruierten chimären Konstrukte nicht hemmt (Tab. 1), genügt die A/B-Domäne von HNF4 α nicht, um die Hemmbarkeit einer DNA-Bindung durch Inhibitor auf einen heterologen Transkriptionsfaktor zu übertragen.

Die E- und F-Domäne von HNF4 α sind für die Hemmbarkeit nicht notwendig, da die HNF4 Δ EF-DNA-Bindung durch Inhibitor gehemmt wird (Tab. 1).

Der zweite Assay ist die Wirkung des Inhibitors auf das Laufverhalten der HNF4-Proteine. Die Gelmobilität von HNF4 α wird durch Inhibitor verringert (Tab. 1). Auch HNF4 Δ AB zeigt nach Inkubation mit Inhibitor verringerte Gelmobilität, übereinstimmend mit dem Befund, dass die HNF4 Δ AB/DNA-Bande im Gelretardationsassay durch Inhibitor verändert wird (Tab. 1). Da aber im Gelretardationsassay die HNF4 Δ AB/DNA-Bande durch Inhibitor weder verlangsamt noch gehemmt wird, wirkt der Inhibitor nur auf einen Teil des HNF4 Δ AB-Proteins, während ein anderer Teil des Proteins in einer Konformation vorliegen muss, die DNA bindet und durch den Inhibitor nicht im Gel verlangsamt wird. Ein weiterer Hinweis darauf, dass die Inhibitorwirkung nicht an der A/B-Domäne

ansetzt, ist der Befund, dass die Gelmobilität der chimären Konstrukte aus A/B-Domäne von HNF4 α und HNF1 α , Mt(α 1)HNF1 α und Mt(α 7)HNF1 α , durch Inhibitor nicht beeinflusst wird (Tab. 1).

Das HNF4 Δ EF-Protein läuft, obwohl es kleiner ist, im nativen Proteingel deutlich langsamer als HNF4 α -Volllängenprotein oder HNF4 Δ AB. Das kann nicht auf eine geringere Nettoladung des Proteins zurückzuführen sein, da der isoelektrische Punkt (pI) von HNF4 Δ EF mit 4,5 niedriger liegt als der des Volllängen-HNF4 α (pI 4,9). Möglicherweise liegt HNF4 Δ EF in einer ausgestreckteren Konformation vor, bildet ein Multimer oder interagiert mit Faktoren aus dem Kernextrakt. Die Gelmobilität von HNF4 Δ EF wird durch Inhibitor im Gegensatz zu HNF4 α oder HNF4 Δ AB erhöht (Abb. 25c). Da sowohl DNA-Bindung als auch Gelmobilität von HNF4 Δ EF durch Inhibitor beeinflusst werden, spielen die E-oder F-Domäne von HNF4 α keine Rolle für die Hemmung der DNA-Bindung durch Inhibitor.

Die Tatsache, dass das Laufverhalten von HNF4 Δ AB und von HNF4 Δ EF durch Inhibitor beeinflusst wird, spricht dafür, dass die Inhibitorwirkung an einer Sequenz von HNF4 α zwischen den Aminosäuren 55 und 153 ansetzt. In diesem Bereich liegen die DNA-Bindedomäne und der größte Teil der daran anschließenden D-Domäne („hinge region“).

Konstrukt	Hemmbarkeit der DNA-Bindung durch Inhibitor	Veränderung der Gelmobilität durch Inhibitor	Abb.
HNF4 α 1	+	verringert	20, 23
HNF4 Δ AB	*	verringert	20, 25b
Mt(α 1)HNF1 α ,	-	unverändert	22, 25 a
Mt(α 7)HNF1 α	-	unverändert	
HNF4 Δ EF	+	erhöht	19, 25c

Tab. 1: Vergleich der Wirkungen von HNF4-Inhibitor auf DNA-Bindung und Gelmobilität von HNF4 α und abgeleiteten Konstrukten (*: Bande scheint komprimiert)

Dass die DNA-Bindedomäne (DBD) ein Angriffsort für die Regulation der DNA-Bindung eines Transkriptionsfaktors sein kann, ist einsichtig und durch Untersuchungen belegt. So können zum einen Modifikationen in der DBD die DNA-Affinität von Kernrezeptoren verändern. Die Phosphorylierung von Ser-350 in der DBD des Orphan-Rezeptors NGFI-B (Nur-77) vermindert die Affinität der DBD zu einem Erkennungselement (Hirata et al., 1993). Auch in HNF4 α vermindert die Phosphorylierung von Serinresten in der DBD die DNA-Affinität (Viollet et al., 1997). Zum anderen kann die Bindung von Faktoren an die DBD die DNA-Bindung beeinträchtigen. Beispielsweise bindet Calreticulin an eine Sequenz in der DNA-Bindedomäne des Glucocorticoid-Rezeptors und hemmt dessen DNA-Bindung (Burns et al., 1994, Dedhar et al., 1994).

Auch für die D-Domäne („hinge region“) von Kernrezeptoren sind Interaktionen mit anderen Faktoren belegt. So ist die Bindung des Korepressors NCoR an den Thyroidhormonrezeptor vor allem von der Anwesenheit der „hinge region“ abhängig (Hörlein et al., 1995).

Einen direkten Beweis für den in dieser Arbeit kartierten Wirkort würde die isolierte Expression der Aminosäuren 55-153 mit anschließender Untersuchung auf die Gelmobilität dieses Fragmentes mit und ohne Inhibitor ergeben.

Zur genaueren Kartierung müsste man weitergehende Deletionskonstrukte untersuchen und/oder Punktmutationen einführen. Eine „natürliche Punktmutation“ von HNF4 α ist D69A, die in der humanen Hepatomazelllinie HepG2 gefunden wurde (Lausen et al., 2000) und bei der eine Aminosäure in der P-Box des ersten Zinkfingers der DNA-Bindedomäne von HNF4 α ausgetauscht ist. Diese Aminosäure ist zwischen Insekten und Säugern konserviert (Sladek, 1994), was potentiell auf eine wichtige Funktion schließen lässt. Die Mutante verhält sich allerdings ähnlich wie Wildtyp-HNF4 α , sie zeigt nur auf einigen Promotoren eine leicht erhöhte Transaktivierung (Lausen et al., 2000). Die DNA-Bindung dieser Mutante ist durch Inhibitor in gleichem Maße hemmbar wie Wildtyp-HNF4 α (Daten nicht gezeigt).

6. Der Inhibitor könnte durch Modifikation oder direkte Bindung auf HNF4 α wirken

Folgende Möglichkeiten können als Mechanismen, wie der HNF4-Inhibitor auf das HNF4 α -Protein wirkt, diskutiert werden:

1. Modifikation von HNF4 α :

Wie in der Einleitung dargestellt, wird die DNA-Affinität von HNF4 α durch Phosphorylierung verändert. Der Inhibitor könnte somit durch eine Änderung des Phosphorylierungsmusters von HNF4 α wirken.

Gegen eine ausgeprägte Veränderung des Phosphorylierungsgrades spricht allerdings, dass das Laufverhalten von HNF4 α im SDS-Proteingel nach Inkubation mit Inhibitor nicht verändert ist (Abb. 24), während die Phosphorylierung anderer Kernfaktoren oft auf diese Weise im Proteingel nachzuweisen ist (z. B. Denner et al., 1990, Sheridan et al., 1989, Zhang et al., 1995, Joel et al., 1995).

Auch kann der Inhibitor die Phosphorylierung von HNF4 α nicht direkt beeinflussen, da die inhibitorische Komponente proteaseresistent, also kein Enzym wie z. B. eine Kinase oder Phosphatase ist. Der Inhibitor könnte eine Kinase oder Phosphatase aktivieren, die in den für die Gelretardation eingesetzten Zellextrakten vorhanden sind. Falls diese Enzyme im Reticulocytenlysat fehlen, könnte ein solches Modell auch die mangelnde Hemmbarkeit des *in vitro* synthetisierten HNF4 α erklären.

Wenn der Phosphorylierungsgrad von HNF4 Δ EF und Volllängen-HNF4 durch Inhibitor in gleicher Weise geändert würde, würde man allerdings erwarten, dass beide im nativen Gel entweder erhöhte oder erniedrigte Mobilität zeigen. Stattdessen wird die Gelmobilität von HNF4 Δ EF durch Inhibitor erhöht, die von Volllängen-HNF4 α dagegen erniedrigt (Abb. 25c). Daher ist nicht anzunehmen, dass eine Phosphorylierung von HNF4 α allein die Wirkung des Inhibitors ist. Falls die Inhibitorwirkung über eine Veränderung des Phosphorylierungsgrades von HNF4 α verlaufen sollte, würde die Änderung des Phosphorylierungszustandes wahrscheinlich nachfolgende Schritte, z.B. die Bindung eines anderen Faktors beeinflussen (s. u.).

2. Veränderung des Oligomerisierungsgrades von HNF4 α :

Der Oligomerisierungsgrad kann die Aktivität von Kernrezeptoren beeinflussen. Für den nächsten Verwandten von HNF4 α , RXR, wird die Bildung von Tetrameren als ein Mechanismus der transkriptionellen Regulation diskutiert, da RXR in Lösung zu einem großen Teil als Tetramer vorliegt und erst nach Ligandenbindung in kleinere Untereinheiten dissoziiert (Kersten et al., 1995, Chen und Privalsky, 1995, Kersten et al., 1997a, b).

HNF4 α liegt in Lösung als stabiles Homodimer vor (Jiang et al., 1995). Der Inhibitor könnte dadurch wirken, dass er, durch Bindung oder Modifikation von HNF4 α , das Gleichgewicht hin zur Bildung von Monomeren oder höheren Oligomeren verschiebt. Dagegen spricht jedoch der Befund, dass durch Inhibitor die Gelmobilität von HNF4 Δ EF erhöht, die von Vollängen-HNF4 α verringert wird. Wenn der Oligomerisierungsgrad erhöht würde, müssten beide nach Inkubation mit Inhibitor eine niedrigere Gelmobilität haben. Eine Veränderung des Oligomerisierungsgrads von HNF4 α durch den Inhibitor ist daher nach meinen Ergebnissen nicht anzunehmen.

3. Bindung von Faktoren aus dem Kernextrakt an HNF4 α :

Der Inhibitor könnte die Bindung von Faktoren aus den Kernextrakten an HNF4 α beeinflussen. Falls es sich um Faktoren handelt, die im Reticulocytenlysat nicht vorkommen, könnte sich so auch die schlechte Hemmbarkeit und fehlende Gelmobilitätsänderung des *in vitro* synthetisierten HNF4 α erklären.

Für HNF4 α sind Interaktionen mit den Kofaktoren CBP (Yoshida et al., 1997), SRC1 und GRIP1 (Wang et al., 1998, Sladek et al., 1999) sowie mit dem Orphan-Rezeptor SHP (Lee et al., 2000) gezeigt worden. Außerdem bindet es an einige Faktoren der basalen Transkriptionsmaschinerie. Die Aminosäuren 1-118 von HNF4 α interagieren mit TFIIB (Malik und Karathanasis, 1996). Die Aktivierungsfunktion 1 (Aminosäuren 1-24) bindet an TBP und TAFs (Green et al., 1998), was allerdings für die Inhibitorwirkung keine Rolle spielen kann, da der Inhibitor auch die Gelmobilität von HNF4 Δ AB verändert, dem diese N-terminalen Aminosäuren fehlen.

Die Bindung eines Faktors aus den Kernextrakten wäre vereinbar mit der Beobachtung, dass sich die Gelmobilität von Vollängen-HNF4 α nach Inkubation mit Inhibitor erniedrigt, die von HNF4 Δ EF dagegen erhöht: Während beim Vollängen-HNF4 α die zusätzliche Größe, nicht die Ladung eines gebundenen Moleküls ausschlaggebend sein könnte für eine Verringerung der Gelmobilität, könnte beim viel langsamer laufenden

HNF4 Δ EF eine zusätzliche negative Ladung ein schnelleres Laufverhalten bewirken. Diese Argumentation trifft auch auf eine direkte Bindung von Inhibitor an HNF4 α zu.

4. Bindung des Inhibitors an HNF4 α :

Der einfachste und naheliegendste Wirkmechanismus ist eine direkte Bindung des Inhibitors an die DNA-Bindedomäne von HNF4 α . Im Fall einer direkten Bindung könnte man erwarten, dass das kleinere proteaseresistente Inhibitorfragment den Lauf von HNF4 α im nativen Gel weniger stark verlangsamen würde als der intakte Inhibitor. HNF4 α wird jedoch durch proteaseresistenten Inhibitor in gleichem Maße verlangsamt wie durch ganzen Inhibitor (Abb. 23c). Das widerspricht allerdings nicht zwingend einer Bindung von Inhibitor an HNF4 α , da das gleiche Elutionsverhalten von Inhibitor und proteaseresistentem Fragment von der MonoQ-Säule (Abb. 13) auf ähnliche Ladungseigenschaften beider Moleküle schließen lässt.

In Koimmunpräzipitationsversuchen konnte keine direkte Bindung von Inhibitor an HNF4 α nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Trotzdem kann eine direkte Bindung nicht ausgeschlossen werden, die vielleicht zu schwach ist, um nach den Waschschritten noch genügend Mengen an Inhibitor zum Nachweis im Gelretardationsassay zu erhalten. Eine direkte Bindung von Inhibitor an HNF4 α könnte nach Aufklärung der Struktur des Inhibitors untersucht werden, indem man den Inhibitor radioaktiv markiert und eine spezifische Bindung der Radioaktivität an HNF4 α analysiert.

7. Ansatzmöglichkeiten zur Klärung der physiologischen Bedeutung des HNF4-Inhibitors

Wie in der Einleitung dargestellt, könnte der Inhibitor in der *Xenopus*-Embryogenese eine wichtige Rolle spielen, indem er die Aktivität des maternalen HNF4 α zeitlich und räumlich einschränkt. Um dieser Hypothese nachzugehen, habe ich folgende Analysen durchgeführt (alle Daten nicht gezeigt):

In Ektodermexplantaten aus *Xenopus*-Embryonen im Blastulastadium (animalen Kappen) kann nach dreitägiger Inkubation mit Aktivin A unter anderem die Expression von HNF1 α induziert werden. Das Aktivin-responsible Element im HNF1 α -Promotor ist die

HNF4 α -Bindestelle (Weber et al., 1996a). Die Induktion könnte daher durch Deaktivierung des HNF4-Inhibitors zustandekommen. Um diese Möglichkeit zu überprüfen, habe ich mit und ohne Aktivin inkubierte animale Kappen auf das Vorhandensein von Inhibitor geprüft. Nach drei Tagen enthielten weder die mit Aktivin behandelten noch die unbehandelten Kappen mehr HNF4-Inhibitor. Das steht in Übereinstimmung mit der Tatsache, dass der Inhibitor im Laufe der Embryogenese verschwindet. Der Befund spricht allerdings dagegen, dass eine Deaktivierung des Inhibitors allein für eine HNF1 α -Induktion durch das maternale HNF4 α ausreicht.

Die Wirkung von Substanzen auf die Embryogenese kann in *Xenopus* durch Mikroinjektion in Eier oder frühe Embryonalstadien untersucht werden. Die proteinfreie Inhibitorpräparation nach Pronaseverdau, Phenol/Chloroform-Extraktion und MonoQ-Aufreinigung konnte so weit aufkonzentriert werden, dass eine Inhibitormenge, deren Hemmaktivität der von 5 *Xenopus*-Eiern entsprach, in ein Volumen von 10 nl gebracht und somit in ein Ei injiziert werden konnte. Eine solche Präparation habe ich in verschiedenen Verdünnungsstufen zusammen mit mRNA für GFP in eine Blastomere des Zwei-Zell-Stadiums injiziert, um zu untersuchen, ob ein Zuviel an Inhibitor spezifische Entwicklungsänderungen auslöst. Bei geringen Inhibitorkonzentrationen zeigten die entstandenen Embryonen keinen auffälligen Phänotyp, bei höheren Konzentrationen wirkte die Präparation toxisch.

Ein anderer Ansatz zur Untersuchung einer Inhibitorwirkung *in vivo* war, Inhibitor zusammen mit HNF4 α -mRNA in Eier zu injizieren und dann die HNF1 α -Induktion durch HNF4 α in einem frühen Entwicklungsstadium mittels RT-PCR zu messen. Vorversuche ergaben jedoch, dass die mit HNF4 α -mRNA injizierten Embryonen eine derart unterschiedliche HNF1 α -Induktion zeigten, dass ein Effekt des Inhibitors kaum signifikant hätte nachgewiesen werden können.

Wenn der Inhibitor HNF4 α bindet und seine Bindestelle in HNF4 α genau kartiert ist, könnte man, um endogenen Inhibitor abzufangen, diese Bindestelle injizieren und untersuchen, ob die Aktivität des endogenen HNF4 α dann zunimmt. Der Versuch setzt allerdings voraus, dass die Inhibitor-Bindestelle selbst nicht an DNA bindet.

Ob eine physiologische Rolle des Inhibitors in der *Xenopus*-Embryogenese überhaupt in Frage kommt, könnte durch Lokalisierung des HNF4-Inhibitors geklärt werden. Dabei müsste zum einen untersucht werden, ob er im Zellkern vorkommt, zum anderen, ob er in

Embryonalstadien mit HNF4 α kolokalisiert ist. Es wurde durch Gelretardationsanalyse von Extrakten aus verschiedenen Bereichen früher Embryonalstadien bereits gezeigt, dass Inhibitor dort gleichermaßen im animalen und vegetativen Bereich von Acht-Zell-Stadien und frühen Gastrulastadien vorhanden ist (Holewa, 1995). Eine genauere Lokalisierung in Zellen und Geweben würde durch Herstellung von Antikörpern möglich. Dazu müsste eine genügend große Menge Inhibitor zur Immunisierung aufgereinigt werden, oder man könnte, falls der Inhibitor eine Peptidsequenz enthält, Antikörper gegen ein synthetisches Peptid generieren.

Im adulten Tier könnte Inhibitor in Geweben, die HNF4 α exprimieren, zur Regulation der HNF4 α -Aktivität beitragen. Die Liganden einiger Kernrezeptoren, die zunächst als Orphan-Rezeptoren gefunden worden waren, sind intrazelluläre Produkte des intermediären Stoffwechsels. Die Kernrezeptoren FXR und LXR beispielsweise werden durch Abbauprodukte des Cholesterols zu Gallensäuren reguliert (Makishima et al., 1999, Parks et al., 1999, Wang et al., 1999, Janowski et al., 1996) und spielen wichtige Rollen in der Cholesterol-Homöostase (zusammengefasst in Russell, 1999), deren Bedeutung durch die Fehlregulation des Cholesterolmetabolismus in der LXR-„knockout“-Maus unterstrichen wird (Peet et al., 1998). Eine ähnliche Rolle in der Regulation des intermediären Stoffwechsels könnten Acyl-CoA-Verbindungen als Liganden von HNF4 α spielen (Hertz et al., 1998), deren physiologische Bedeutung als HNF4 α -Regulatoren jedoch noch nicht geklärt ist.

Analog dazu könnte der HNF4-Inhibitor ein endogener Metabolit sein, der auch in Organen eine regulatorische Funktion auf HNF4 α ausübt, auch wenn er nicht als klassischer Ligand auf HNF4 α wirkt. Um diese Möglichkeit zu untersuchen, habe ich Extrakte aus *Xenopus*-Leber, die wie die *Xenopus*-Eiextrakte hergestellt wurden, in Gelretardationsversuchen auf einen Einfluss auf die DNA-Bindung von HNF4 α untersucht. Diese Extrakte veränderten jedoch die HNF4 α -DNA-Bindung nicht, selbst wenn eine Konzentration eingesetzt wurde, die dem 200fachen einer inhibitorisch wirksamen Menge an Eiextrakt entsprach, und sie kompetierten auch die Inhibitorwirkung auf die HNF4 α -DNA-Bindung nicht (Daten nicht gezeigt). Dieser Befund spricht dagegen, dass in der adulten Leber eine dem Inhibitor chemisch ähnliche Substanz regulatorisch auf die HNF4 α -DNA-Bindung wirkt.

Um eine Wirkung des Inhibitors *in vivo* zu untersuchen, habe ich versucht, ihn in Zellkultur durch Diffusion oder Transfektion in Zellen einzubringen. Beide Methoden führten nicht zu einer spezifischen Abnahme der Transaktivierung eines HNF4 α -Reporterkonstruktes. Die einzige Möglichkeit, Inhibitorwirkung in Zellkultur zu untersuchen, wäre damit die Einzelzellinjektion.

8. Der HNF4-Inhibitor als potentielles Werkzeug zur Beeinflussung der Aktivität von HNF4 α

Ob der HNF4-Inhibitor eine physiologische Funktion bei der Regulation von HNF4 α in der *Xenopus*-Embryogenese hat, bleibt zu klären. Doch selbst wenn es sich herausstellen würde, dass er *in vivo* nicht an der Regulation von HNF4 α beteiligt ist, kann er als Werkzeug zur Beeinflussung der Aktivität von HNF4 α nützlich sein.

Der HNF4-Inhibitor könnte zur Entwicklung eines Therapeutikums HNF4 α -abhängiger Krankheiten führen. Wie in der Einleitung dargestellt, zählen dazu die Diabetesform MODY1 sowie andere Stoffwechselkrankheiten, an deren Entstehung Zielgene von HNF4 α beteiligt sind. Wenn der Inhibitor die DNA-Affinität von HNF4 α herabsetzt, ist es denkbar, aus seinem Wirkmechanismus einen gegensätzlich wirkenden Mechanismus zur Erhöhung der HNF4 α -DNA-Affinität abzuleiten. Voraussetzung dazu ist die Aufklärung von Struktur und Funktionsweise des Inhibitors.

Das Verständnis des Wirkmechanismus des Inhibitors könnte zudem helfen, einen potentiellen endogenen Aktivierungs- bzw. Deaktivierungsmechanismus von HNF4 α zu entdecken. HNF4 α scheint konstitutiv aktiv sein, aber für einen Transkriptionsfaktor mit wichtigen Rollen in Embryogenese und Homöostase ist zu erwarten, dass seine Aktivität posttranslational moduliert wird. Da die Wege und Mechanismen der Regulation von Orphan-Rezeptoren ganz allgemein noch wenig verstanden sind, wäre die Aufklärung einer Regulationsmöglichkeit von großem Interesse und könnte wiederum zur Entwicklung eines Therapeutikums führen.

V. Zusammenfassung

Eier und frühe Embryonalstadien von *Xenopus* enthalten eine Substanz, die die DNA-Bindung von HNF4 α inhibiert und an der Regulation von HNF4 α in der *Xenopus*-Embryogenese beteiligt sein könnte. Die Charakterisierung der molekularen Identität und der Wirkweise dieses HNF4-Inhibitors war Ziel der vorliegenden Arbeit

Wie meine Ergebnisse zeigen, besteht der HNF4-Inhibitor aus einem proteaseresistenten, inhibitorisch wirksamen Anteil und enthält außerdem einen Peptidteil oder mindestens zwei Peptidbindungen. Eine Beteiligung eines Nukleinsäureanteils oder N-glykosidisch gebundenen Zuckers an der inhibitorischen Funktion konnte ausgeschlossen werden, ebenso eine Funktion als Zink-Chelator. Der Inhibitor ist größer als der Porendurchmesser einer 5 kDa-Membran. Er ist hydrophil und bei pH 8,8 negativ geladen.

Durch Verdau mit Pronase, Extraktion in Phenol/Chloroform und Ethanol-fällung ist es möglich, eine proteinfreie Präparation des proteaseresistenten Teils des Inhibitors für weitere Analysen zu gewinnen.

In seiner Wirkweise unterscheidet sich der HNF4-Inhibitor von den als HNF4 α -Liganden vorgeschlagenen Acyl-CoenzymA-Thioestern durch eine größere Spezifität der Hemmwirkung auf HNF4 α .

Der Inhibitor wirkt nicht als klassischer Ligand auf HNF4 α , da die DNA-Bindung eines HNF4 α -Konstruktes ohne Ligandenbindungsdomäne (HNF4 Δ EF) ebenfalls durch Inhibitor gehemmt wird.

Die A/B-Domäne hat eine Bedeutung für die DNA-Affinität von HNF4 α und für die Hemmbarkeit der DNA-Bindung durch Inhibitor, da ein Konstrukt ohne A/B-Domäne (HNF4 Δ AB) nur schwach an DNA bindet, diese Bindung durch Inhibitor jedoch nicht gehemmt wird. Dass der HNF4-Inhibitor dennoch auf einen Teil des HNF4 Δ AB-Proteins wirkt, zeigt sich in der Änderung der Gelmobilität dieses Konstruktes.

Mit der Wirkung des Inhibitors auf Konstrukte ohne A/B- und ohne E/F-Domäne kann die Wirkung des Inhibitors auf die C- und D-Domäne des HNF4 α -Proteins (Aminosäuren 55-153) kartiert werden. Als Wirkmechanismus ist eine direkte Bindung an die C-Domäne

(DNA-Bindedomäne) naheliegend, der Inhibitor könnte aber auch die posttranslationale Modifikation, den Oligomerzustand oder die Bindung anderer Faktoren an HNF4 α beeinflussen.

Der Inhibitor verändert spezifisch die Mobilität des HNF4 α -Proteins in einem nativen Proteingel und dessen Zugänglichkeit für einen Antikörper. Damit ist nachgewiesen, dass er auch unabhängig von Protein-DNA-Interaktionen spezifisch das HNF4 α -Protein verändert.

Die damit gezeigte klare Spezifität des Inhibitors und sein Wirkort in der C/D-Domäne weisen auf einen bisher unbekannten Regulationsmechanismus für HNF4 α hin. Eine weitere Untersuchung dieses Mechanismus könnte zur Aufklärung der Rolle von HNF4 α in HNF4 α -exprimierenden Zellen beitragen und einen Ansatzpunkt bieten, die Aktivität von HNF4 α zu modulieren, was in Hinblick auf die HNF4 α -bedingten Stoffwechselkrankheiten von großem Interesse ist.

Literatur

Allan GF, Leng X, Tsai SY, Weigel NL, Edwards DP, Tsai M-J, O'Malley BW (1992). Hormone and antihormone induce distinct conformational changes which are central to steroid receptor activation. *J. Biol. Chem.* 267, 19513-19520

Bartkowski S, Zapp D, Weber H, Eberle G, Zoidl C, Senkel S, Klein-Hitpass L, Ryffel GU (1993). Developmental regulation and tissue distribution of the liver transcription factor LFB1 (HNF1) in *Xenopus laevis*. *Mol. Cell. Biol.* 13, 421-431

Beato M, Herrlich P, Schütz G (1995). Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. *Cell* 83, 851-857

Behrens J, Jerchow BA, Wurtele M, Grimm J, Asbrand C, Wirtz R, Kuhl M, Wedlich D, Birchmeier W (1998). Functional interaction of an axin homolog, conductin, with β -catenin, APC, and GSK3 β . *Science* 280, 596-599

Blumberg B, Evans RM (1998). Orphan nuclear receptors – new ligands and new possibilities. *Genes Dev.* 12, 3149-3155

Blumberg B, Bolado J, Derguini F, Craig AG, Moreno TA, Chakravarti D, Heyman RA, Buck J, Evans RM (1996). Novel retinoic acid receptor ligands in *Xenopus* embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 4873-4878

Blumberg B, Kang H, Bolado J, Chen H, Craig AG, Moreno TA, Umesono K, Perlmann T, deRobertis EM, Evans RM (1998). BXR, an embryonic orphan nuclear receptor activated by a novel class of endogenous benzoate metabolites. *Genes Dev.* 12, 1269-1277

Brannon M, Brown JD, Bates R, Kimelman D, Moon RT (1999). XCtBP is a XTcf-3 co-repressor with roles throughout *Xenopus* development. *Development* 126, 3159-3170

Brannon M, Comperts M, Sumoy L, Moon RT, Kimelman D (1997). A β -catenin/XTcf-3 complex binds to the siamois promoter to regulate dorsal axis specification in *Xenopus*. *Genes Dev.* 11, 2359-2370

Breslow JL (1988). Apolipoprotein genetic variation and human disease. *Physiol. Rev.* 68, 85-132

Bulla GA, Fournier REK (1994). Genetic analysis of a transcriptional activation pathway by using hepatoma cell variants. *Mol. Cell. Biol.* 14, 7086-7094

Burns K, Duggan B, Atkinson EA, Famulski KS, Nemer M, Bleackley RC, Michalak M (1994). Modulation of gene expression by calreticulin binding to the glucocorticoid receptor. *Nature* 367, 476-480

Cadigan KM, Nusse R (1997). Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev.* 11, 3286-3305

Cereghini S (1996). Liver-enriched transcription factors and hepatocyte differentiation. *FASEB J.* 10, 267-282

Cereghini S, Yaniv M, Cortese R (1990). Hepatocyte dedifferentiation and extinction is accompanied by a block in the synthesis of mRNA coding for the transcription factor HNF1/LFB1. *EMBO J.* 9, 2257-2263

Chen H, Privalsky ML (1995). Cooperative formation of higher-order oligomers by retinoid X receptors: An unexpected mode of DNA recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 422-426

Chen WS, Manova K, Weinstein DC, Duncan SA, Plump AS, Prezioso VR, Bachvarova RF, Darnell JE Jr. (1994). Disruption of the HNF-4 gene, expressed in visceral endoderm, leads to cell death in embryonic ectoderm and impaired gastrulation of mouse embryos. *Genes Dev.* 8, 2466-2477

Choi H-S, Chung M, Tzameli I, Simha D, Lee Y-K, Seol W, Moore DD (1997). Differential transactivation by two isoforms of the orphan nuclear hormone receptor CAR. *J. Biol. Chem.* 272, 23565-23571

Conlon RA (1995). Retinoic acid and pattern formation in vertebrates. *Trends Genet.* 11, 314-319

Costa RH, Grayson DR, Darnell JE Jr. (1989). Multiple hepatocyte-enriched nuclear factors function in the regulation of the transthyretin and α_1 -antitrypsin genes. *Mol. Cell Biol.* 9, 1415-1425

Courtois G, Baumhueter S, Crabtree GR (1988). Purified hepatocyte nuclear factor 1 interacts with a family of hepatocyte-specific promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 7937-7941

Crystal RG (1989). The alpha 1-antitrypsin gene and its deficiency states. *Trends Genet.* 5, 411-417

Dedhar S, Rennie PS, Shago M, Leung Hagesteijn C-Y, Yang H, Filmus J, Hawley RG, Bruchovsky N, Cheng H, Matusik RJ, Giguère V (1994). Inhibition of nuclear hormone receptor activity by calreticulin. *Nature* 367, 480-483

Denner LA, Schrader WT, O'Malley BW, Weigel NL (1990). Hormonal regulation and identification of chicken progesterone receptor phosphorylation sites. *J. Biol. Chem.* 265, 16548-16555

Drewes T, Senkel S, Holewa B, Ryffel GU (1996). Human hepatocyte nuclear factor 4 isoforms are encoded by distinct and differentially expressed genes. *Mol. Cell Biol.* 16, 925-931

Duncan SA, Manova K, Chen WS, Hoodless P, Weinstein DC, Bachvarova RF, Darnell JE Jr. (1994). Expression of transcription factor HNF-4 in the extraembryonic endoderm, gut, and nephrogenic tissue of the developing mouse embryo: HNF-4 is a marker for primary endoderm in the implanting blastocyst. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 7598-7602

Duncan SA, Nagy A, Chan W (1997). Murine gastrulation requires HNF-4 regulated gene expression in the visceral endoderm: tetraploid rescue of HNF-4^{-/-} embryos. *Development* 124, 279-287

Duncan SA, Navas A, Dufort D, Rossant J, Stoffel M (1998). Regulation of a transcription factor network required for differentiation and metabolism. *Science* 281, 692-695

Durston AJ, van der Wees J, Pijnappel WW, Godsave SF (1998). Retinoids and related signals in early development of the vertebrate central nervous system. *Curr. Top. Dev. Biol.* 40, 111-175

- Enmark E, Gustafsson J-A (1996).** Orphan nuclear receptors – the first eight years. *Mol. Endocrinol.* 10, 1293-1307
- Evan GI, Lewis GK, Ramsey G, Bishop JM (1985).** Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto-oncogene product. *Mol. Cell. Biol.* 5, 3610-3616
- Farr GH 3rd, Ferkey DM, Yost C, Pierce SB, Weaver C, Kimelman D (2000).** Interaction among GSK-3, GBP, axin, and APC in *Xenopus* axis specification. *J. Cell Biol.* 148, 691-702
- Forman BM, Tzameli I, Choi H-S, Chen J, Simha D, Seol W, Evans RM, Moore DD (1998).** Androstane metabolites bind to and deactivate the nuclear receptor CAR- β . *Nature* 395, 612-614
- Fuernkranz HA, Wang Y, Karathanasis SK, Mak P (1994).** Transcriptional regulation of the apo AI gene by hepatic nuclear factor 4 in yeast. *Nucleic Acids Res.* 22, 5665-5671
- Fuhrmann U, Parczyk K, Klotzbücher M, Klocker H, Cato ACB (1998).** Recent developments in molecular action of antihormones. *J. Mol. Med.* 76, 512-524
- Glinka A, Wu W, Onichtchouk D, Blumenstock C, Niehrs C (1997).** Head induction by simultaneous repression of BMP and Wnt signalling in *Xenopus*. *Nature* 389, 517-519
- Gorman CM, Moffat LF, Howard BH (1982).** Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyltransferase in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* 2, 1044-1051
- Gradl D, Kühl M, Wedlich D (1999).** Keeping a close eye on Wnt-1/wg signaling in *Xenopus*. *Mech. Dev.* 86, 3-15
- Green VJ, Kokkotou E, Ladas JAA (1998).** Critical structural elements and multitarget protein interactions of the transcriptional activator AF-1 of hepatocyte nuclear factor 4. *J. Biol. Chem.* 273, 29950- 29957
- Gragnoli C, Lindner T, Cockburn BN, Kaisaki PJ, Gragnoli F, Marozzi G, Bell GI (1997).** Maturity-onset diabetes of the young due to a mutation in the hepatocyte nuclear factor-4 α binding site in the promoter of the hepatocyte nuclear factor-1 α gene. *Diabetes* 46, 1648-1651
- Griffo G, Hamon-Benais C, Angrand P-O, Fox M, West L, Lecoq O, Povey S, Cassio D, Weiss M (1993).** HNF4 and HNF1 as well as a panel of hepatic functions are extinguished and reexpressed in parallel in chromosomally reduced rat hepatoma-human fibroblast hybrids. *J. Cell Biol.* 121, 887-898
- Guo W, Chen M, Yen TS, Ou JH (1993).** Hepatocyte-specific expression of the hepatitis B virus core promoter depends on both positive and negative regulation. *Mol. Cell. Biol.* 13, 443-448
- Hadzopoulou-Cladaras M, Kistanova E, Evagelopoulos C, Zeng S, Cladaras C, Ladas JAA (1997).** Functional domains of the nuclear receptor Hepatocyte Nuclear Factor 4. *J. Biol. Chem.* 272, 539-550
- Hart GW (1997).** Dynamic O-linked glycosylation of nuclear and cytoskeletal proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 66, 315-335
- Heasman J (1997).** Patterning the *Xenopus* blastula. *Development* 124, 4179-4191
- Heasman J, Crawford A, Goldstone K, Garner-Hamrick P, Gumbiner B, McCrea P, Kintner C, Noro CY, Wylie C (1994).** Overexpression of cadherins and underexpression of β -catenin inhibit dorsal mesoderm induction in early *Xenopus* embryos. *Cell* 79, 791-803

- Hertz R, Magenheimer J, Berman I, Bar-Tana J (1998).** Fatty acyl-CoA thioesters are ligands of hepatic nuclear factor-4 α . *Nature* 392, 512-516
- Hirata Y, Kiuchi K, Chen H-C, Milbrandt J, Guroff G (1993).** The phosphorylation and DNA binding of the DNA-binding domain of the orphan nuclear receptor NGFI-B. *J. Biol. Chem.* 268, 24808-24812
- Holewa B (1995).** Eine Transkriptionskaskade in der Vertebraten-Embryogenese: HNF4, ein maternaler Faktor, der an der Aktivierung des gewebespezifischen Transkriptionsfaktors LFB1 beteiligt ist. Dissertation an der Universität-Gesamthochschule Essen
- Holewa B, Pogge von Strandmann E, Zapp D, Lorenz P, Ryffel GU (1996).** Transcriptional hierarchy in *Xenopus* embryogenesis: HNF4 a maternal factor involved in the developmental activation of the gene encoding the tissue specific transcription factor HNF1 α (LFB1). *Mech. Dev.* 54, 45-57
- Holewa B, Zapp D, Drewes T, Senkel S, Ryffel GU (1997).** HNF4 β , a new gene of the HNF4 family with distinct activation and expression profiles in oogenesis and embryogenesis of *Xenopus laevis*. *Mol. Cell. Biol.* 17, 687-694
- Hollemann T, Chen Y, Grunz H, Pieler T (1998).** Regionalized metabolic activity establishes boundaries of retinoic acid signalling. *EMBO J.* 17, 7361-7372
- Hörlein AJ, Näär AM, Heinzel T, Torchia J, Gloss B, Kurokawa R, Ryan A, Kamei Y, Söderström M, Glass CK, Rosenfeld MG (1995).** Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature* 377, 397-404
- Janowski BA, Willy PJ, Rama Devi T, Falck JR, Mangelsdorf DJ (1996).** An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR α . *Nature* 383, 728-731
- Jiang G, Nepomuceno L, Hopkins K, Sladek FM (1995).** Exclusive homodimerization of the orphan receptor hepatocyte nuclear factor 4 defines a new subclass of nuclear receptors. *Mol. Cell. Biol.* 15, 5131-5143
- Jiang G, Nepomuceno L, Yang Q, Sladek FM (1997).** Serine/threonine phosphorylation of orphan receptor hepatocyte nuclear factor 4. *Arch. Biochem. Biophys.* 340, 1-9
- Joel PB, Traish AM, Lannigan DA (1995).** Estradiol and phorbol ester cause phosphorylation of serine 118 in the human estrogen receptor. *Mol. Endocrinol.* 9, 1041-1052
- Kersten S, Kelleher D, Chambon P, Gronemeyer H, Noy N (1995).** Retinoid X receptor α forms tetramers in solution. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 8645-8649
- Kersten S, Gronemeyer H, Noy N (1997a).** The DNA binding pattern of the retinoid X receptor is regulated by ligand-dependent modulation of its oligomeric state. *J. Biol. Chem.* 272, 12771-12777
- Kersten S, Reczek PR, Noy N (1997b).** The tetramerization region of the retinoid X receptor is important for transcriptional activation by the receptor. *J. Biol. Chem.* 272, 29759-29768
- Ktistaki E, Talianidis I (1997).** Modulation of hepatic gene expression by hepatocyte nuclear factor 1. *Science* 277, 109-112

- Ktistaki E, Ktistakis NT, Papadogeorgaki E, Talianidis I (1995).** Recruitment of hepatocyte nuclear factor 4 into specific intranuclear compartments depends on tyrosine phosphorylation that affects its DNA-binding and transactivation potential. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 9876-9880
- Kugler W, Kaling M, Ross K, Wagner U, Ryffel GU (1990).** BAP, a rat liver protein that activates transcription through a promoter element with similarity to the USF/MLTF binding site. *Nucl. Acids Res.* 18, 6943-6951
- Kumar R, Thompson EB (1999).** The structure of the nuclear hormone receptors. *Steroids* 64, 310-319
- Kuo CJ, Conley PB, Chen L, Sladek FM, Darnell JE Jr., Crabtree GR (1992).** A transcriptional hierarchy involved in mammalian cell-type specification. *Nature* 355, 457-461
- Laurent MN, Blitz IL, Hashimoto C, Rothbächer U, Cho KW-Y (1997).** The *Xenopus* homeobox gene *Twin* mediates Wnt induction of goosecoid in establishment of Spemann's organizer. *Development* 124, 4905-4916
- Lausen J, Thomas H, Lemm I, Bulman M, Borgschulze M, Lingott A, Hattersley AT, Ryffel GU (2000).** Naturally occurring mutations in the human HNF4 α gene impair the function of the transcription factor to a varying degree. *Nucl. Acids Res.* 28, 430-437
- Lazennec G, Ediger TR, Petz LN, Nardulli AM, Katzenellenbogen BS (1997).** Mechanistic aspects of estrogen receptor activation probed with constitutively active estrogen receptors: correlations with DNA and coregulator interactions and receptor conformational changes. *Mol. Endocrinol.* 11, 1375-1386
- Li J, Ning G, Duncan SA (2000).** Mammalian hepatocyte differentiation requires the transcription factor HNF-4 α . *Genes Dev.* 14, 464-474
- Lin BC, Hong SH, Krig S, Yoh SM, Privalsky ML (1997).** A conformational switch in nuclear hormone receptors is involved in coupling hormone binding to corepressor release. *Mol. Cell. Biol.* 17, 6131-6138
- Leng X, Tsai SY, O'Malley BW, Tsai M-J (1993).** Ligand-dependent conformational changes in thyroid hormone and retinoic acid receptors are potentially enhanced by heterodimerization with retinoic X receptors. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 46, 643-661
- Makishima M, Okamoto AY, Repa JJ, Tu H, Learned RM, Luk A, Hull MV, Lustig KD, Mangelsdorf DJ, Shan B (1999).** Identification of a nuclear receptor for bile acids. *Science* 284, 1362-1365
- Malik S, Karathanasis SK (1996).** TFIIB-directed transcriptional activation by the orphan nuclear receptor hepatocyte nuclear factor 4. *Mol. Cell. Biol.* 16, 1824-1831
- Mangelsdorf DJ, Evans RM (1995).** The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* 83, 841-850
- Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schütz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evans RM (1995).** The nuclear receptor superfamily: The second decade. *Cell* 83, 835-839
- Mann M, Wilm M (1995).** Electrospray mass spectrometry for protein characterization. *Trends Biochem. Sci.* 20, 219-224

- McGrew LL, Hoppler S, Moon RT (1997).** Wnt and FGF pathways cooperatively pattern anteroposterior neural ectoderm in *Xenopus*. *Mech. Dev.* 69, 105-114
- McGrew LL, Takemaru K-I, Bates R, Moon RT (1999).** Direct regulation of the *Xenopus engrailed-2* promoter by the Wnt signaling pathway, and a molecular screen for Wnt-responsive genes, confirm a role for Wnt signaling during neural patterning in *Xenopus*. *Mech. Dev.* 87, 21-32
- Means AL, Gudas LJ (1995).** The roles of retinoids in vertebrate development. *Annu. Rev. Biochem.* 64, 201-233
- Miquerol L, Lopez S, Cartier N, Tulliez M, Raymondjean M, Kahn A (1994).** Expression of the L-type pyruvate kinase gene and the hepatocyte nuclear factor 4 transcription factor in exocrine and endocrine pancreas. *J. Biol. Chem.* 269, 8944-8951
- Moon RT, Brown JD, Torres M (1997).** WNTs modulate cell fate and behavior during vertebrate development. *Trends Genet.* 13, 157-162
- Moras D, Gronemeyer H (1998).** The nuclear receptor ligand-binding domain: structure and function. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10, 384-391
- Müller-Fahrnow A, Egner U (1999).** Ligand-binding domain of estrogen receptors. *Curr. Opin. Biotechnol.* 10, 550-556
- Nakhei H (1997).** Das regulatorische Potential des gewebespezifischen Transkriptionsfaktors HNF4 α . Dissertation an der Universität-Gesamthochschule Essen
- Nakhei H, Lingott A, Lemm I, Ryffel GU (1998).** An alternative splice variant of the tissue specific transcription factor HNF4 α predominates in undifferentiated murine cell types. *Nucl. Acids Res.* 26, 497-504
- Nastos A, Pogge von Strandmann E, Weber H, Ryffel GU (1998).** The embryonic expression of the tissue-specific transcription factor HNF1 α in *Xenopus*: rapid activation by HNF4 and delayed induction by mesoderm inducers. *Nucl. Acids Res.* 26, 5602-5608
- Niehrs C (1999).** Head in the WNT: the molecular nature of Spemann's head organizer. *Trends Genet.* 15, 314-319
- Nuclear Receptors Nomenclature Committee (1999).** A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily. *Cell* 97, 161-163
- Nusse R (1999).** WNT targets: repression and activation. *Trends Genet.* 15, 1-3
- O'Malley BW, Conneely OM (1992).** Orphan receptors: in search of a unifying hypothesis for activation. *Mol. Endocrinol.* 6, 1359-1361
- Parks DJ, Blanchard SG, Bledsoe RK, Chandra G, Consler TG, Kliewer SA, Stimmel JB, Willson TM, Zavacki AM, Moore DD, Lehmann JM (1999).** Bile acids: Natural ligands for an orphan nuclear receptor. *Science* 284, 1365-1368
- Peet DJ, Turley SD, Ma W, Janowski BA, Lobaccaro JMA, Hammer RE, Mangelsdorf DJ (1998).** Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR α . *Cell* 93, 693-704
- Picard D (1998).** Two orphans find a home. *Nature* 395, 543-544

Pogge von Strandmann E (1995). Wechselspiel gewebespezifischer Transkriptionsfaktoren in der Embryogenese von Vertebraten. Dissertation an der Universität-Gesamthochschule Essen

Pogge von Strandmann E, Nastos A, Holewa B, Senkel S, Weber H, Ryffel GU (1997). Patterning the expression of a tissue-specific transcription factor in embryogenesis: HNF1 α gene activation during *Xenopus* development. *Mech. Dev.* 64, 7-17

Power RF, Lydon JP, Conneely OM, O'Malley BW (1991). Dopamine activation of an orphan of the steroid receptor superfamily. *Science* 252, 1546-1548

Raney AK, Johnson JL, Palmer CN, McLachlan A (1997). Members of the nuclear receptor superfamily regulate transcription from the hepatitis B virus nucleocapsid promoter. *J. Virol.* 71, 1058-1071

Reijnen MJ, Peerlinck K, Maasdam D, Bertina RM, Reitsma PH (1993). Hemophilia B Leyden: substitution of thymine for guanine at position -21 results in a disruption of a hepatocyte nuclear factor 4 binding site in the factor IX promoter. *Blood* 82, 151-158

Reijnen MJ, Sladek FM, Bertina RM, Reitsma PH (1992). Disruption of a binding site for hepatocyte nuclear factor 4 results in hemophilia B Leyden. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 6300-6303

Ryffel G, Lingott A (2000). Distinct promoter elements mediate endodermal and mesodermal expression of the HNF1 α promoter in transgenic *Xenopus*. *Mech. Dev.* 90, 65-75

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989). Molecular cloning – a laboratory manual (2nd edition) Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, New York

Schägger H, von Jagow G (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 166, 368-379

Schorpp M, Kugler W, Wagner U, Ryffel GU (1988). Hepatocyte-specific promoter element HP-1 of the *Xenopus* albumin gene interacts with transcriptional factors of mammalian hepatocytes. *J. Mol. Biol.* 202, 307-320

Sel S, Ebert T, Ryffel GU, Drewes T (1996). Human renal cell carcinogenesis is accompanied by a coordinate loss of the tissue specific transcription factors HNF4 α and HNF1 α . *Cancer Lett.* 101, 205-210

Sheridan PL, Evans RM, Horwitz KB (1989). Phosphotryptic peptide analysis of human progesterone receptor. New phosphorylated sites formed in nuclei after hormone treatment. *J. Biol. Chem.* 264, 6520-6528

Sive HL, Grainger RM, Harland RM (Eds.) (1995). Early development of *Xenopus laevis*. Course Manual, Cold Spring Harbour (3rd edition)

Sladek FM (1994). Hepatocyte nuclear factor 4 (HNF4). In: Tronche F, Yaniv M (eds.): Liver gene expression. R. G. Landes Company 1994

Sladek FM, Ruse MD, Jr., Nepomuceno L, Huang S-M, Stallcup MR (1999). Modulation of transcriptional activation and coactivator interaction by a splicing variation in the F domain of nuclear receptor hepatocyte nuclear factor 4 α 1. *Mol. Cell. Biol.* 19, 6509-6522

- Sladek FM, Zhong W, Lai E, Darnell JE (1990).** Liver-enriched transcription factor HNF-4 is a novel member of the steroid hormone receptor superfamily. *Genes Dev.* 4, 2353-2365
- Snow DM, Hart GW (1998).** Nuclear and cytoplasmic glycosylation. *Int. Rev. Cytol.* 181, 43-74
- Stumpf H, Senkel S, Rabes HM, Ryffel GU (1995).** The DNA binding activity of the liver transcription factors LFB1 (HNF1) and HNF4 varies coordinately in rat hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis* 16, 143-145
- Sucov HM, Evans RM (1995).** Retinoic acid and retinoic acid receptors in development. *Mol. Neurobiol.* 10, 169-184
- Swevers L, Iatrou K (1998).** The orphan receptor BmHNF-4 of the silkworm *Bombyx mori*: ovarian and zygotic expression of two mRNA isoforms encoding polypeptides with different activating domains. *Mech. Dev.* 72, 3-13
- Taraviras S, Monaghan AP, Schütz G, Kelsey G (1994).** Characterization of the mouse HNF-4 gene and its expression during mouse embryogenesis. *Mech. Dev.* 48, 67-79
- Tian J-M, Schibler U (1991).** Tissue-specific expression of the gene encoding hepatocyte nuclear factor 1 may involve hepatocyte nuclear factor 4. *Genes Dev.* 5, 2225-2234
- Torchia J, Glass C, Rosenfeld MG (1998).** Co-activators and co-repressors in the integration of transcriptional responses. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10, 373-383
- Tronche F, Yaniv M (1992).** HNF1, a homeoprotein member of the hepatic transcription regulatory network. *Bioessays* 14, 579-586
- Viollet B, Kahn A, Raymondjean M (1997).** Protein kinase A-dependent phosphorylation modulates DNA-binding activity of hepatocyte nuclear factor 4. *Mol. Cell. Biol.* 17, 4208-4219
- Wang H, Chen J, Hollister K, Sowers LC, Forman BM (1999).** Endogenous bile acids are ligands for the nuclear receptor FXR/BAR. *Mol. Cell* 3, 543-553
- Wang JC, Stafford JM, Granner DK (1998).** SRC-1 and GRIP-1 coactivate transcription with hepatocyte nuclear factor 4. *J. Biol. Chem.* 273, 30847-30850
- Weber H, Holewa B, Jones EA, Ryffel GU (1996a).** Mesoderm and endoderm differentiation in animal cap explants: identification of the HNF4-binding site as an activin A responsive element in the *Xenopus* HNF1 α promoter. *Development* 122, 1975-1984
- Weber H, Pogge von Strandmann E, Holewa B, Bartkowski S, Zapp D, Zoidl C, Ryffel GU (1996b).** Regulation and function of the tissue-specific transcription factor HNF1 α (LFB1) during *Xenopus* development. *Int. J. Dev. Biol.* 40, 297-304
- Weigel N (1996).** Steroid hormone receptors and their regulation by phosphorylation. *Biochem. J.* 319, 657-667
- Wild W, Pogge von Strandmann E, Nastos A, Senkel S, Lingott-Frieg A, Bulman M, Bingham C, Ellard S, Hattersley AT, Ryffel GU (2000).** The mutated human gene encoding hepatocyte nuclear factor 1 β inhibits kidney formation in developing *Xenopus* embryos. Angenommen von Proc. Natl. Acad. Sci. 22.02.2000

Willy PJ, Mangelsdorf DJ (1998). Nuclear orphan receptors: the search for novel ligands and signaling pathways. In: Hormones and signaling (ed. O'Malley BW), Vol. 1, 307-358. Academic Press, San Diego, CA

Xu J, Nawaz Z, Tsai SY, Tsai M-J, O'Malley BW (1996). The extreme C terminus of progesterone receptor contains a transcriptional repressor domain that functions through a putative corepressor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 12195-12199

Yamagata K, Furuta H, Oda N, Kaisaki PJ, Menzel S, Cox NJ, Fajans SS, Signorini S, Stoffel M, Bell GI (1996a). Mutations in the hepatocyte nuclear factor-4 α gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY1). Nature 384, 458-460

Yamagata K, Oda N, Kaisaki PJ, Menzel S, Furuta H, Vaxillaire M, Southam L, Cox RD, Lathrop GM, Boriraj VV, Chen X, Cox NJ, Oda Y, Yano H, Le Beau MM, Yamada S, Nishigori H, Takeda J, Fajans SS, Hattersley AT, Iwasaki N, Hansen T, Pedersen O, Polonsky KS, Turner RC, Velho G, Chèvre J-C, Froguel P, Bell GI (1996b). Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1 α gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY3). Nature 384, 455-458

Yoshida E, Aratani S, Itou H, Miyagishi M, Takiguchi M, Osumu T, Murakami K, Fukamizu A (1997). Functional association between CBP and HNF4 in trans-activation. Biochem. Biophys. Res. Commun. 241, 664-669

Zapp D, Bartkowski S, Holewa B, Zoidl C, Klein-Hitpass L, Ryffel GU (1993). Elements and factors involved in tissue-specific and embryonic expression of the liver transcription factor LFB1 in *Xenopus laevis*. Mol. Cell. Biol. 13, 6416-6426

Zeng Z, Allan GF, Thaller C, Cooney AJ, Tsai SY, O'Malley BW, Tsai M-J (1994). Detection of potential ligands for nuclear receptors in cellular extracts. Endocrinology 135, 248-252

Zhang Y, Beck CA, Poletti A, Edwards DP, Weigel NL (1995). Identification of a group of Ser-Pro motif hormone-inducible phosphorylation sites in the human progesterone receptor. Mol. Endocrinol. 9, 1029-1040

Zhong W, Sladek FM, Darnell JE (1993). The expression pattern of a Drosophila homolog to the mouse transcription factor HNF-4 suggests a determinative role in gut formation. EMBO J. 12, 537-544

Danksagungen

Die vorliegende Arbeit wurde im Labor von Prof. Dr. G. U. Ryffel am Institut für Zellbiologie der Universität-Gesamthochschule Essen durchgeführt.

Ich danke Prof. Dr. Ryffel für die Überlassung des interessanten Themas, seine zahlreichen Anregungen zum Fortgang der Arbeit und seine ständige Diskussionsbereitschaft.

Herrn Dr. H. Prinz, MPI Dortmund, danke ich für seine Hilfsbereitschaft und die interessante Zusammenarbeit am Massenspektrometer.

Bedanken möchte ich mich auch bei Dr. K. Krüger für die Aufreinigung diverser Inhibitorpräparationen mittels reversed phase-HPLC.

Bei Dr. L. Klein-Hitpass und Fabian Esser bedanke ich mich für die anhaltende Versorgung mit Ratten-Leberkernextrakten.

Außerdem danke ich allen Mitgliedern der AG III und der Nachwuchsgruppe für die kollegiale Zusammenarbeit und das gute Arbeitsklima, ganz besonders Ira Lemm für ihre moralische Unterstützung und Jörn Lausen für viele Aufklärungen, das Korrekturlesen und das perfekte Krisenmanagement in der letzten Woche.

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 7 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Ein Inhibitor des zellspezifischen Transkriptionsfaktors HNF4 α in frühen *Xenopus*-Embryos“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Frau Gudrun Peiler befürworte.

Essen, d. 17.04.2000

Prof. Dr. G. U. Ryffel

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 6 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, d. 17.04.2000

Gudrun Peiler

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 8 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist.

Essen, d. 17.04.2000

Gudrun Peiler